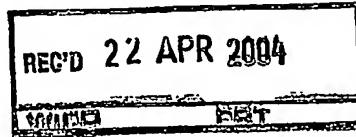
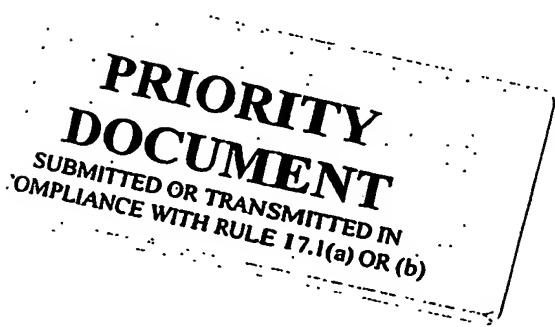


## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 103 11 118.2  
**Anmeldetag:** 12. März 2003  
**Anmelder/Inhaber:** BASF Plant Science GmbH,  
67056 Ludwigshafen/DE  
**Bezeichnung:** Verfahren zur Erhöhung der Resistenz gegen  
Stressfaktoren in Pflanzen  
**IPC:** C 07 K, C 12 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 25. März 2004  
 Deutsches Patent- und Markenamt  
 Der Präsident  
 Im Auftrag

Ebert

Verfahren zur Erhöhung der Resistenz gegen Streßfaktoren in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Streßfaktor in Pflanzen, bevorzugt gegen pflanzliche Pathogene, durch Erhöhung der Expression mindestens eines Bax-Inhibitor 1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt. Die Erfindung betrifft ferner rekombinante Expressionskassetten und Vektoren, die eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors umfassen, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist. Die Erfindung betrifft ferner mit besagten Expressionskassetten oder Vektoren transformierte rekombinante Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder rekombinantes Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika. Oft sind die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzerkrankungen führen zu Ernteverlusten in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken. Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfraß in Tabak durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen (Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.

40

Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen, vor allem Pilzpathogene, verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endogene Botenstoffe wie Jasmonat (JA) oder

Salizylsäure (SA) vermittelt werden (Ward et al. (1991) Plant Cell 3:1085-1094; Uknas et al. (1992) Plant Cell 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-5-7-thiocarbonsäure-S-methylester (BTH; Bion®) (Friedrich et al. (1996) Plant J 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) Plant J 10:71-82) bewirkt werden. Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hochregulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.

In Gerste ist der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte, rassen-unspezifische Resistenz gegen zahlreiche Mehltauisolate (Büsches R et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790).

Das Mlo-Gen ist beschrieben (Büsches R et al. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Mlo-Homologe aus anderen Getreidearten wurden isoliert. Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552). Nachteilig ist, dass Mlo-defiziente Pflanzen auch in Abwesenheit eines Pathogens den o.g. Abwehrmechanismus initiieren, was sich in einem spontanen Absterben von Blattzellen äußert (Wolter M et al. (1993) Mol Genet 239:122-128). Dadurch erleiden mlo-resistente Pflanzen eine Ertragseinbuße von ca. 5% (Jörgensen JH (1992) Euphytica 63: 141-152). Das spontane Absterben der Blattzellen bedingt ferner eine nachteilige Hypersuszeptibilität gegen nekrotrophe und hemibiotrophe Pathogene wie *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*) oder *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*) (Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133).

Faktoren die einen der mlo-Resistenz vergleichbaren Effekt gegen nekrotrophe Pilze vermitteln, konnten bislang nicht identifiziert werden. Dies mag an dem besonderen Infektionsmechanismus der nekrotrophen Pilze liegen: Anstelle einer Appressorien-vermittelten Penetration infundieren sie zunächst die pflanzliche Wirtszelle mit Mykotoxinen und Enzymen, was zu einem Absterben der Zelle führt. Erst danach wird die Zelle penetriert (Shirasu K and Schulze-Lefert P (2000) Plant Mol Biol 44:371-385). Ähnliche Infektionsstrategien verfolgen

bakterielle Pathogene wie *Erwinia carotovora* (Whitehead NA et al. (2002) Antonie van Leeuwenhoek 81: 223-231). Eine Penetrationsresistenz mit Hilfe von Papillenbildung etc. stellt hier keine effiziente Abwehrstrategie dar.

5 Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist ein  
essentieller Mechanismus zur Aufrechterhaltung der  
Gewebehomöostase und steht damit der Zellteilung als negativ  
regulierender Mechanismus gegenüber. Im vielzelligen Organismus  
10 ist die Apoptose ein natürlicher Bestandteil der Ontogenese und  
u.a. an der Entwicklung der Organe und der Beseitigung von  
gealterten, infizierten oder mutierten Zellen beteiligt. Durch  
die Apoptose wird eine effiziente Elimination von unerwünschten  
Zellen erreicht. Eine Störung oder Inhibition der Apoptose trägt  
15 zur Pathogenese verschiedener Erkrankungen bei, unter anderem  
zur Karzinogenese. Die Haupteffektoren der Apoptose sind  
Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen, die sogenannten  
Caspasen. Ihre Aktivierung kann durch mindestens zwei Apoptose-  
Signalwege stattfinden: Zum einen durch die Aktivierung der TNF-  
20 (Tumor Necrosis Factor) Rezeptorfamilie, zum anderen spielen  
Mitochondrien eine zentrale Rolle. Die Aktivierung des  
mitochondrialen Apoptose-Signalweges wird durch Proteine der  
Bcl-2-Familie reguliert. Diese Proteinfamilie besteht aus anti-  
apoptotischen sowie pro-apoptotischen Proteinen wie z.B. Bax. Im  
25 Falle eines apoptotischen Stimulus findet eine allosterische  
Konformationsänderung des Bax-Proteins statt, welche zur  
Verankerung des Proteins in der mitochondrialen Außenmembran und  
seiner Oligomerisierung führt. Durch diese Oligomere werden pro-  
apoptotischen Moleküle aus den Mitochondrien ins Zytosol  
30 freigesetzt, die eine apoptotische Signalkaskade und letztlich  
die Degradierung spezifischer zellulärer Substrate bedingen, was  
den Zelltod zur Folge hat. Der Bax Inhibitor-1 BII wurde über  
seine Eigenschaft isoliert, die pro-apoptotische Wirkung von BAX  
zu inhibieren (Xu Q & Reed JC (1998) Mol Cell 1(3): 337-346).  
35 BII stellt ein hochkonserviertes Protein dar. Es findet sich  
überwiegend als integraler Bestandteil intrazellulärer  
Membranen. BII interagiert mit bcl-2 und bcl-xL. Überexpression  
von BII in Säugetierzellen unterdrückt die pro-apoptotische  
Wirkung von BAX, Etoposid und Staurosporin, aber nicht von Fas-  
40 Antigen (Roth W and Reed JC (2002) Nat Med 8: 216-218). Die  
Inhibition von BII durch antisense-RNA hingegen induziert  
Apoptose (Xu Q & Reed JC (1998) Mol Cell 1(3):337-346). Die  
ersten pflanzlichen Homologen von BII wurden aus Reis und  
Arabidopsis isoliert (Kawai et al. (1999) FEBS Lett 464:143-147).

Sanchez et al (2000) Plant J 21:393-399). Diese pflanzlichen Proteine supprimieren BAX-induzierten Zelltod in Hefe. Die Aminosäure-Sequenzhomologie zu menschlichem BI1 beträgt ca. 45%.

Das Arabidopsis-Homolog AtBI1 vermag in rekombinanten Pflanzen die pro-apoptotische Wirkung von BAX aus Maus zu supprimieren (Kawai-Yamada et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(21):12295-12300). Das Reis (*Oryza sativa*) BI1-Homolog OsBI1 wird in allen pflanzlichen Geweben exprimiert (Kawai et al. (1999) FEBS Lett 464: 143-147). Beschrieben sind ferner BI1-Gene aus Gerste (*Hordeum vulgare*; GenBank Acc.-No.: AJ290421), Reis (GenBank Acc.-No.: AB025926), Arabidopsis (GenBank Acc.-No.: AB025927), Tabak (GenBank Acc.-No.: AF390556) und Raps (GenBank Acc.-No.: AF390555, Bolduc N et al. (2003) Planta 216:377-386). Die Expression von BI1 in Gerste wird infolge einer Infektion mit 15 Mehltau hochreguliert (Hückelhoven R et al. (2001) Plant Mol Biol 47(6):739-748).

WO 00/26391 beschreibt die Überexpression der anti-apoptotischen Gene Ced-9 aus *C. elegans*, sflAP aus *Spodoptera frugiperda*, bcl-2 aus Mensch sowie bcl-xL aus Huhn in Pflanzen zur Erhöhung der Resistenz gegen nekrotrophe bzw. hemibiotrophe Pilze.

Pflanzliche BI1 Homologe werden nicht offenbart. Die Expression erfolgt unter Kontrolle konstitutiver Promotoren. Beschrieben ist ferner die Expression eines BI1 Proteins aus Arabidopsis unter dem starken konstitutiven 35S CaMV Promotor in Reiszellen und eine dadurch induzierte Resistenz gegen Zelltod induzierende Substanzen aus *Magnaporthe grisea* (Matsumura H et al. (2003) Plant J 33:425-434).

Überraschenderweise wurde im Rahmen dieser Erfindung gefunden, dass eine konstitutive Expression eines BI1-Proteins zwar eine Resistenz gegen nekrotrophe Pilze bedingt, jedoch ein Brechen der mlo-vermittelten Resistenz gegen obligat-biotrophen Echten 30 Mehltau (siehe Vergleichsversuch 1) zur Folge hat. Dies stellt den wirtschaftlichen Nutzen der im Stand der Technik beschriebenen Verfahren in Frage.

Es bestand die Aufgabe, Verfahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine effiziente Abwehr pflanzlicher 40 Pathogene (bevorzugt nekrotropher Pathogene) ermöglichen, ohne eine ggf. bestehende Resistenz gegen andere Pathogene (wie beispielsweise biotrophe Pathogene) zu brechen. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Stressfaktor in Pflanzen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfaßt sind

5 a) Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines Bax Inhibitor-1 (BII) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattempidermis im wesentlichen unverändert bleibt, und

10 b) Auswahl der Pflanzen, bei denen im Vergleich zur Ausgangspflanze eine Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Stressfaktor besteht oder erhöht ist.

15 Bevorzugt ist der biotische oder abiotische Stressfaktor ein Pathogen, besonders bevorzugt ein Pathogen ausgewählt aus der Gruppe der nekrotrophen und hemibiotrophen Pathogene.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion des BII-Proteins wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifisch, besonders bevorzugt mesophyll-spezifisch, beispielsweise durch rekombinante Expression einer für besagtes BII-Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifischen Promotors, bevorzugt unter Kontrolle eines mesophyll-spezifischen Promotors.

30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines pflanzlichen BII-Proteins kombiniert werden mit einem mlo-resistenten Phänotyp und so eine kombinierte Resistenz gegen sowohl nekrotrophe als auch biotrophe Pathogene gewähren.

35 Das BII-Protein aus Gerste (hvBII) wird vorwiegend im Mesophyll exprimiert (Beispiel 6) und infolge einer Infektion mit Blumeria (syn. Erysiphe) graminis f. sp. hordei hochreguliert (Beispiel 2). Die rekombinante mesophyll-spezifische Überexpression in mlo-resistenter Gerste führt - neben der Resistenz gegen insbesondere nekrotrophe und hemibiotrophe Pathogene - zu einer Blumeria (syn. Erysiphe) graminis f. sp. hordei -resistenten Pflanze, die keine nekrotischen Flecken („mlo-Flecken“; negative Begleiterscheinung der mlo-Resistenz) zeigt. Unter Ausnutzen dieses Effekts lassen sich die negativen Begleiterscheinungen

der mlo-vermittelten Resistenz (Ertragseinbuße von ca. 5%,  
Jørgensen JH (1992) *Euphytica* 63: 141-152); Hypersuszeptibilität  
gegen nekrotrophe Pilze, Jarosch B et al. (1999) *Mol Plant  
Microbe Interact* 12:508-514; Kumar J et al. (2001)

5 *Phytopathology* 91:127-133) unterdrücken, ohne dass die mlo-  
Resistenz selber beeinträchtigt wird.

Ferner kann überraschenderweise gezeigt werden, dass eine  
Überexpression von BII eine Resistenz gegen Stressfaktoren wie  
10 nekrosen-auslösende Agenzien (isoliert z.B. aus nekrotrophen  
Schadpilzen; Beispiel 2) zur Folge hat.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet demnach eine effiziente  
biotechnologische Strategie der Resistenz gegen Nekrotisierung  
15 durch endogenen, abiotischen und biotischen Stress -  
beispielsweise mlo-Flecken, Ozonschäden, nekrotrophe und  
hemibiotrophe Schadorganismen.

BII-Proteine scheinen zentrale Regulatoren der rasse-  
20 unspezifischen Pilzresistenz in Pflanzen zu sein. Dies  
ermöglicht eine breite Einsetzbarkeit in biotechnologischen  
Strategien zur Erhöhung der Pathogenresistenz in Pflanzen  
insbesondere der Pilzresistenz. Das erfindungsgemäße Verfahren  
25 kann im Prinzip auf alle Pflanzenarten angewendet werden. BII-  
Proteine wurden in zahlreichen Pflanzen - Monokotyledonen und  
Dikotyledonen - identifiziert (s.o.).

"Ungefähr" meint im Rahmen dieser Erfindung im Zusammenhang mit  
Zahlen- oder Größenangaben einen Zahlen- oder Größenbereich um  
30 den angegebenen Zahlen- oder Größenwert herum. Im allgemeinen  
meint der Begriff ungefähr einen Bereich von jeweils 20% des  
angegebenen Wertes nach oben und nach unten.

"Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten  
35 höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches.  
Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen,  
Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile,  
Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und  
andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen  
40 Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder  
strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem  
beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling  
meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen  
Entwicklungsstadium.

"Pflanze" umfaßt alle einjährige und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen

5 Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Ciahorium, 10 Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.

15 Der Begriff "Pflanze" umfaßt bevorzugt monokotyledone Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis, Sorghum oder Hafer sowie Zuckerrohr.

20 Ferner umfaßt der Begriff dikotyledonen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

- Brassicaceae wie Raps, Rübsen, Kresse, Arabidopsis, 25 Kohlarten,

- Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuß

30 - Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika,

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula,

35 - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini,

sowie Lein (Flachs), Baumwolle, Hanf, Klee, Spinat, Roter Pfeffer, Möhre, Karotte, Rübe, Rettich, Zuckerrübe, Süßkartoffel, Gurke, Chicorée, Blumenkohl, Brokkoli, Spargel,

40 Zwiebel, Knoblauch, Sellerie, Erdbeere, Himbeere, Brombeere, Ananas, Avocado, und den verschiedenen Baum-, Strauch-, Nuß- und Weinarten. Baumarten umfaßt bevorzugt Pflaume, Kirsche, Pfirsich, Nektarine, Aprikose, Banane, Papaya, Mango, Apfel,

Birne, Quitte.

Im Rahmen der Erfindung sind solche Pflanzen bevorzugt, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen, ganz besonders bevorzugt monokotyledone Gattungen und Arten mit landwirtschaftlicher Bedeutung wie Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr.

Der Begriff "Streßfaktor" umfaßt im Rahmen der vorliegenden Erfindung biotische Streßfaktoren (wie insbesondere die unten aufgeführten Pathogene) sowie abiotische Streßfaktoren. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend sind als abiotische Streßfaktoren zu nennen: Chemischer Stress (z.B. durch Agrar- und/oder Umweltchemikalien), US-Bestrahlung, Hitze, Kälte, Wassermangel, erhöhte Feuchtigkeit.

"Streßresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von Symptomen einer Pflanze infolge von Stress. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

"Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch mindestens ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

"Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Stress- oder Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Stress- oder Pathogenart etc.) eine erhöhte Resistenz gegen ein und mehrere Stressfaktoren bzw. Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten

Ausprägung der Stress- oder Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die Pflanze oder pflanzliche Zellen oder die

5 Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfaßt. Dabei sind die Stress- oder Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 % vermindert.

10 "Auswahl" meint in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens einen Stressfaktor oder Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren, die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Stress- bzw. Pathogenresistenz geeignet sind. Dies können beispielsweise Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Nekrosen-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel usw. betreffen.

15 "Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Viren oder Viroide, Bakterien, Pilze, tierische Schädlinge, wie beispielsweise Insekten oder Nematoden. Besonders bevorzugt sind Pilze, insbesondere nekrotrophe oder hemibiotrophe Pilze. Es ist jedoch anzunehmen, dass die mesophyll-spezifische Expression eines B11-Proteins auch eine Resistenz gegen weitere Pathogene bewirkt, da insgesamt eine Resistenz gegen Stressfaktoren erzeugt wird.

20 Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende Pathogene zu nennen:

25 1. Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene:

30 Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti). Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 bis 4 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen. Folgende

englische und deutsche Termini können alternativ verwendet werden:

5      Ährenfäule      -      ear rot / head blight  
 Stengelfäule      -      stalk rot  
 Wurzelfäule      -      root rot  
 Rost      -      rust  
 Falscher Mehltau      downy mildew

10     Weiter Übersetzungen können beispielsweise bei  
<http://www.bba.de/english/database/psmengl/pilz.htm> gefunden werden.

15     Tabelle 1:     Erkrankungen     hervorgerufen     durch     biotrophe,  
 phytopathogene Pilze

Erkrankung	Pathogen
Braunrost	<i>Puccinia recondita</i>
Gelbrost	<i>P. striiformis</i>
Echter Mehltau	<i>Erysiphe graminis</i> / <i>Blumeria graminis</i>
Rost (gemeiner Mais)	<i>Puccinia sorghi</i>
Rost (südlicher Mais)	<i>Puccinia polysora</i>
Tabak Blattflecken	<i>Cercospora nicotianae</i>
Rost (tropischer Mais)	<i>Physopella pallescens</i> , <i>P. zeae</i> = <i>Angiopsora zeae</i>

20     Tabelle 2:     Erkrankungen hervorgerufen durch nekrotrophe  
 und/oder hemibiotrophe Pilze und Oomyceten

Erkrankung	Pathogen
Spelzenbräune	<i>Septoria (Stagonospora) nodorum</i>
Blattdürre	<i>Septoria tritici</i>
Ährenfusariosen	<i>Fusarium</i> spp.
Halmbruchkrankheit	<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>
Flugbrand	<i>Ustilago</i> spp.
Kraut- und Knollenfäule	<i>Phytophthora infestans</i>
Weizensteinbrand	<i>Tilletia caries</i>
Schwarzbeinigkeit	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
Anthrocnoise leaf blight	<i>Colletotrichum graminicola</i> (teleomorph: <i>Glomerella graminicola Politis</i> ); <i>Glomerella tucumanensis</i>
Anthracnose stalk rot	

Erkrankung	Pathogen
	(anamorph: <i>Glomerella falcatum</i> Went)
Aspergillus ear and kernel rot	<i>Aspergillus flavus</i>
Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	Rhizoctonia solani Kuhn = Rhizoctonia microsclerotia J. Matz (telomorph: <i>Thanatephorus</i> <i>cucumeris</i> )
Black bundle disease	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams = <i>Cephalosporium acremonium</i> Auct. non Corda
Black kernel rot	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> = <i>Botryodiplodia theobromae</i>
Borde blanco	<i>Marasmiellus</i> sp.
Brown spot (black spot, stalk rot)	<i>Physoderma maydis</i>
Cephalosporium kernel rot	<i>Acremonium strictum</i> = <i>Cephalosporium acremonium</i>
Charcoal rot	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Corticium ear rot	<i>Thanatephorus cucumeris</i> = <i>Corticium sasakii</i>
Curvularia leaf spot	Curvularia clavata, C. <i>eragrostidis</i> , = <i>C. maculans</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus</i> <i>eragrostidis</i> ), Curvularia <i>inaequalis</i> , <i>C. intermedia</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus</i> <i>intermedius</i> ), Curvularia <i>lunata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus</i> <i>lunatus</i> ), Curvularia <i>pallescens</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus</i> <i>pallescens</i> ), Curvularia <i>senegalensis</i> , <i>C.</i> <i>tuberculata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus</i> <i>tuberculatus</i> )
Didymella leaf spot	<i>Didymella exitalis</i>
Diplodia Ähren- und Stengelfäule	Diplodia <i>frumenti</i> (teleomorph: <i>Botryosphaeria</i> <i>festucae</i> )
Diplodia Ähren- und Stengelfäule, seed rot and seedling blight	<i>Diplodia maydis</i> = <i>Stenocarpella maydis</i>
Diplodia leaf spot or streak	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodialeaf macrospora</i>
Brown stripe downy mildew	<i>Sclerophthora rayssiae</i> var. <i>zeae</i>
Crazy top downy mildew	<i>Sclerophthora macrospora</i> = <i>Sclerospora macrospora</i>

Erkrankung	Pathogen
Green ear downy mildew (graminicola downy mildew)	Sclerospora graminicola
Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	Nigrospora oryzae (teleomorph: Khuskia oryzae)
Ährenfäulen (minor)	Alternaria alternata = A. tenuis, Aspergillus glaucus, A. niger, Aspergillus spp., Botrytis cinerea (teleomorph: Botryotinia fuckeliana), Cunninghamella sp., Curvularia pallens, Doratomyces stemonitis = Cephalotrichum stemonitis, Fusarium culmorum, Gonatobotrys simplex, Pithomyces maydicus, Rhizopus microsporus Tiegh., R. stolonifer = R. nigricans, Scopulariopsis brumptii
Ergot (horse's tooth)	Claviceps gigantea (anamorph: Sphacelia sp.)
Eyespot	Aureobasidium zeae = Kabatiella zeae
Fusarium Ähren- und Stengelfäule	Fusarium subglutinans = F. moniliforme var. subglutinans
Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	Fusarium moniliforme (teleomorph: Gibberella fujikuroi)
Fusarium Stengelfäule, seedling root rot	Fusarium avenaceum (teleomorph: Gibberella avenacea)
Gibberella Ähren- u. Stengelfäule	Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum)
Graue Ährenfäule	Botryosphaeria zeae = Physalospora zeae (anamorph: Macrophoma zeae)
Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeae-maydis
Helmintosporium root rot	Exserohilum pedicellatum = Helmintosporium pedicellatum (teleomorph: Setosphaeria pedicellata)
Hormodendrum Ährenfäule (Cladosporium Fäule)	Cladosporium cladosporioides = Hormodendrum cladosporioides, C. herbarum (teleomorph: Mycosphaerella tassiana)
Leaf spots, minor	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victoriae =

Erkrankung	Pathogen
	<i>Helminthosporium victoriae</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus victoriae</i> ), <i>C. sativus</i> (anamorph: <i>Bipolaris sorokiniana</i> = <i>H. sorokinianum</i> = <i>H. sativum</i> ), <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Exserohilum prolatum</i> = <i>Drechslera prolatula</i> (teleomorph: <i>Setosphaeria prolatula</i> ) <i>Graphium penicilllioides</i> , <i>Leptosphaeria maydis</i> , <i>Leptothyrium zaeae</i> , <i>Ophiophaerella herpotricha</i> , (anamorph: <i>Scolecosporiella</i> sp.), <i>Paraphaeosphaeria michotii</i> , <i>Phoma</i> sp., <i>Septoria zaeae</i> , <i>S. zeicola</i> , <i>S. zeina</i>
Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	<i>Setosphaeria turcica</i> (anamorph: <i>Exserohilum turcicum</i> = <i>Helminthosporium turcicum</i> )
Northern corn leaf spot <i>Helminthosporium</i> ear rot (race 1)	<i>Cochliobolus carbonum</i> (anamorph: <i>Bipolaris zeicola</i> = <i>Helminthosporium carbonum</i> )
Penicillium Ährenfäule (blue eye, blue mold)	<i>Penicillium</i> spp., <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. oxalicum</i>
Phaeocystostroma Stengel- und Wurzelfäule	<i>Phaeocystostroma ambiguum</i> , = <i>Phaeocystosporella zaeae</i>
Phaeosphaeria leaf spot	<i>Phaeosphaeria maydis</i> = <i>Sphaerulina maydis</i>
Physalospora Ährenfäule ( <i>Botryosphaeria</i> Ährenfäule)	<i>Botryosphaeria festucae</i> = <i>Physalospora zeicola</i> (anamorph: <i>Diplodia frumenti</i> )
Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
Pyrenopeziza Stengel- und Wurzelfäule	<i>Phoma terrestris</i> = <i>Pyrenopeziza terrestris</i>
Pythium Wurzelfäule	<i>Pythium</i> spp., <i>P. arrhenomanes</i> , <i>P. graminicola</i>
Pythium Stengelfäule	<i>Pythium aphanidermatum</i> = <i>P. butleri</i> L.
Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	<i>Epicoccum nigrum</i>
Rhizoctonia Ährenfäule (sclerotial rot)	<i>Rhizoctonia zaeae</i> (teleomorph: <i>Waitea circinata</i> )
Rhizoctonia Wurzel- und Stengelfäule	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Rhizoctonia zaeae</i>
Wurzelfäulen (minor)	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Cercospora sorghi</i> , <i>Dictyochaeta fertilis</i> , <i>Fusarium acuminatum</i> (teleomorph:

Erkrankung	Pathogen
	Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = He/minthosporium rostratum)
Falscher Java Mehltau	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
Falscher Philippinen Mehltau	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
Falscher Sorghum Mehltau	Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi
Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
Falscher Zuckerrohr-Mehltau	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari
Sclerotium Ährenfäule (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
Seed rot-seedling blight	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicillatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zaeae (anamorph: F. graminearum), Macrophomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zaeae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
Selenophoma leaf spot	Selenophoma sp.
Sheath rot	Gaeumannomyces graminis
Shuck rot	Myrothecium gramineum
Silage mold	Monascus purpureus, M. ruber
Flugbrand (Smut, common)	Ustilago zaeae = U. maydis
Smut, false	Ustilaginoidea virens
Kolbenbrand	Sphacelotheca reiliana =

Erkrankung	Pathogen
(Smut, head)	<i>Sporisorium holcisorghi</i>
Southern corn leaf blight and stalk rot	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> (anamorph: <i>Bipolaris maydis</i> = <i>Helminthosporium maydis</i> )
Southern leaf spot	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodia macrospora</i>
Stengelfäulen (minor)	<i>Cercospora sorghi</i> , <i>Fusarium episphaeria</i> , <i>F. merismoides</i> , <i>F. oxysporum</i> Schlechtend, <i>F. poae</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. solani</i> (teleomorph: <i>Nectria haematococca</i> ), <i>F. tricinctum</i> , <i>Mariannaea elegans</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Rhopographus zaeae</i> , <i>Spicaria</i> sp.
Lagerfäulen (Storage rots)	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp. und weitere Pilze
Tar spot	<i>Phyllachora maydis</i>
Trichoderma ear rot and root rot	<i>Trichoderma viride</i> = <i>T. lignorum</i> teleomorph: <i>Hypocrea</i> sp.
White ear rot, root and stalk rot	<i>Stenocarpella maydis</i> = <i>Diplodia zeae</i>
Yellow leaf blight	<i>Ascochyta ischaemi</i> , <i>Phyllosticta maydis</i> (teleomorph: <i>Mycosphaerella zeae-maydis</i> )
Zonate leaf spot	<i>Gloeocercospora sorghi</i>

Tabelle 4: Erkrankungen hervorgerufen durch Pilze und Oomyceten mit unklarer Einstufung hinsichtlich biotrophen, hemibiotrophen bzw. nekrotrophen Verhaltens

5

Erkrankung	Pathogen
Hyalothyridium leaf spot	<i>Hyalothyridium maydis</i>
Late wilt	<i>Cephalosporium maydis</i>

Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie *Plasmodiophora brassicae*  
10 (Kohlherne), *Spongospora subterranea*, *Polymyxa graminis*,

- Oomycota wie *Bremia lactucae* (Falscher Mehltau an Salat), *Peronospora* (Falscher Mehltau) bei Löwenmaul (*P. antirrhini*), Zwiebel (*P. destructor*), Spinat (*P.*

effusa), Sojabohne (*P. manchurica*), Tabak (Blauschimmel; *P. tabacina*) Alfalfa und Klee (*P. trifolium*), *Pseudoperonospora humuli* (Falscher Mehltau an Hopfen), *Plasmopara* (Falscher Mehltau bei Trauben) (*P. viticola*) und Sonnenblume (*P. halstedii*), *Sclerophtohra macrospora* (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gäsern), *Pythium* (z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch *P. debaryanum*), *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), *Albugo* spec.

10 - Ascomycota wie *Microdochium nivale* (Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule v.a. bei Weizen), *Fusarium oxysporum* (*Fusarium*-Welke an Tomate), *Blumeria graminis* (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. *hordei*) und Weizen (f.sp. *tritici*)), *Erysiphe pisi* (Erbsenmehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Unicnula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea*, *Pyrenophora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).

15 - Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzeltöter an Kartoffeln), *Sphacelotheca* spp. (Kolbenbrand bei Sorghum), *Melampsora lini* (Rost bei Flachs), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* (Gelbrost an Weizen, Gerste, Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (Wurzel- und Stengelfäule bei zahlreichen Pflanzen).

20

25

30

35

40

- Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria* (*Stagonospora*) *nodorum* (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora* *herpotrichoides* (Halmbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen),
- 5 *Rynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-Rübe), *Cercospora beticola* (Cercospora-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (*Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblüttern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum* (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).
- 10
- 15

Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum* und *Fusarium poae* (Ährenfäule an Weizen), *Fusarium oxysporum* (*Fusarium*-Welke an Tomate), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Sclerotinia sclerotiorum* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Septoria* (*Stagonospora*) *nodorum* und *Septoria tritici* (*Spelzenbräune* an Weizen), *Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblüttern), *Phoma lingam* (Umfallkrankheit, Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

### 30 2. Bakterielle Pathogene:

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 5 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

35

Tabelle 5: Bakterielle Erkrankungen

Erkrankung	Pathogen
Bacterial leaf blight and stalk rot	<i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>avenae</i>
Bacterial leaf spot	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>holcicola</i>
Bakterielle Stengelfäule	<i>Enterobacter dissolvens</i> = <i>Erwinia dissolvens</i>
Schwarzbeinigkeit	<i>Erwinia carotovora</i> subsp.

Erkrankung	Pathogen
("Bacterial stalk and top rot")	carotovora, <i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>zeae</i>
Bacterial stripe	<i>Pseudomonas andropogonis</i>
Chocolate spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>
Goss's bacterial wilt and blight (leaf freckles and wilt)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> = <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>andnebraskense</i>
Holcus spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria
Seed rot-seedling blight	<i>Bacillus subtilis</i>
Stewart's disease (bacterial wilt)	<i>Pantoea stewartii</i> = <i>Erwinia stewartii</i>
Corn stunt (achapparramiento, maize stunt, Mesa Central or Rio Grande maize stunt)	<i>Spiroplasma kunkelii</i>

Ganz besonders bevorzugt sind nachfolgende pathogene Bakterien:

*Corynebacterium sepedonicum* (Bakterienringfäule an Kartoffel),

*Erwinia carotovora* (Schwarzbeinigkeit an Kartoffel), *Erwinia*

5 *amylovora* (Feuerbrand an Birne, Apfel, Quitte), *Streptomyces*  
*scabies* (Kartoffelschorf), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*  
 (Wildfeuer an Tabak), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*  
 (Fettfleckenkrankheit an Buschbohne), *Pseudomonas syringae* pv.  
 10 *tomato* ("bacterial speck" an Tomate), *Xanthomonas campestris* pv.  
*malvacearum* (Blattfleckenkrankheit an Baumwolle) und *Xanthomonas*  
*campestris* pv. *oryzae* (Bakterienfäule an Reis und anderen  
 Gräsern).

### 3. Virale Pathogene:

15 "Virale Pathogene" schließt sämtliche Pflanzenviren ein  
 wie beispielsweise Tabak- oder Cucumber-Mosaiv Virus,  
 Ringspot-Virus, Nekrose-Virus, Mais Dwarf-Mosaic Virus etc.

20 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend sind die in Tabelle 6  
 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten  
 Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 6: Virale Erkrankungen

Krankheit	Pathogen
American wheat striate (wheat striate mosaic)	American wheat striate mosaic virus (AWSMV)
Barley stripe mosaic	Barley stripe mosaic virus (BSMV)
Barley yellow dwarf	Barley yellow dwarf virus (BYDV)
Brome mosaic	Brome mosaic virus (BMV)
Cereal chlorotic mottle	Cereal chlorotic mottle virus (CCMV)
Corn chlorotic vein banding (Brazilian maize mosaic)	Corn chlorotic vein banding virus (CCVBV)
Corn lethal necrosis	Viruskomplex aus Maize chlorotic mottle virus (MCMV) und Maize dwarf mosaic virus (MDMV) A oder B oder Wheat streak mosaic virus (WSMV)
Cucumber mosaic	Cucumber mosaic virus (CMV)
Cynodon chlorotic streak	Cynodon chlorotic streak virus (CCSV)
Johnsongrass mosaic	Johnsongrass mosaic virus (JGMV)
Maize bushy stunt	Mycoplasma-like organism (MLO) associated
Maize chlorotic dwarf	Maize chlorotic dwarf virus (MCDV)
Maize chlorotic mottle	Maize chlorotic mottle virus (MCMV)
Maize dwarf mosaic	Maize dwarf mosaic virus (MDMV) strains A, D, E and F
Maize leaf fleck	Maize leaf fleck virus (MLFV)
Maize line	Maize line virus (MLV)
Maize mosaic (corn leaf stripe, enanismo rayado)	Maize mosaic virus (MMV)
Maize mottle and chlorotic stunt	Maize mottle and chlorotic stunt virus
Maize pellucid ringspot	Maize pellucid ringspot virus (MPRV)
Maize raya gruesa	Maize raya gruesa virus (MRGV)
maize rayado fino (fine striping disease)	Maize rayado fino virus (MRFV)
Maize red leaf and red stripe	Mollicute
Maize red stripe	Maize red stripe virus (MRSV)
Maize ring mottle	Maize ring mottle virus (MRMV)
Maize rio IV	Maize rio cuarto virus (MRCV)
Maize rough dwarf (nanismo ruvido)	Maize rough dwarf virus (MRDV) (Cereal tillering disease virus)

Krankheit	Pathogen
Maize sterile stunt	Maize sterile stunt virus (strains of barley yellow striate virus)
Maize streak	Maize streak virus (MSV)
Maize stripe (maize chlorotic stripe, maize hoja blanca)	Maize stripe virus
Maize stunting	Maize stunting virus
Maize tassel abortion	Maize tassel abortion virus (MTAV)
Maize vein enation	Maize vein enation virus (MVEV)
Maize wallaby ear	Maize wallaby ear virus (MWEV)
Maize white leaf	Maize white leaf virus
Maize white line mosaic	Maize white line mosaic virus (MWLMV)
Millet red leaf	Millet red leaf virus (MRLV)
Northern cereal mosaic	Northern cereal mosaic virus (NCMV)
Oat pseudorosette (zakuklivanie)	Oat pseudorosette virus
Oat sterile dwarf	Oat sterile dwarf virus (OSDV)
Rice black-streaked dwarf	Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV)
Rice stripe	Rice stripe virus (RSV)
Sorghum mosaic	Sorghum mosaic virus (SrMV) (auch: sugarcane mosaic virus (SCMV) Stämme H, I and M)
Sugarcane Fiji disease	Sugarcane Fiji disease virus (FDV)
Sugarcane mosaic	Sugarcane mosaic virus (SCMV) strains A, B, D, E, SC, BC, Sabi and MB (formerly MDMV-B)
Wheat spot mosaic	Wheat spot mosaic virus (WSMV)

#### 4. Tierische Schädlinge.

##### 4.1 Insekten Pathogene:

5 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien Insekten wie beispielsweise Käfer, Raupen, Läuse oder Milben zu nennen. Bevorzugt sind Insekten der Gattungen Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc.. Besonders bevorzugt sind Coleoptera and Lepidoptera Insekten, wie beispielsweise den Maiszünsler (European Corn Borer), *Diabrotica barberi*,

10

Diabrotica undecimpunctata, Diabrotica virgifera, Agrotis epsilon, Crymodes devastator, Feltia ducens, Agrotis gladiaria, Melanotus spp., Aeolus mellillus, Aeolus mancus, Horistonotus uhlerii, Sphenophorus maidis, Sphenophorus zeae, Sphenophorus 5 parvulus, Sphenophorus callosus, Phyllophaga spp., Anuraphis maidiradicis, Delia platura, Colaspis brunnea, Stenolophus lecontei und Clivinia impressifrons.

Ferner sind zu nennen: Das Getreidehähnchen (*Oulema melanopus*), 10 die Fritfliege (*Oscinella frit*), Drahtwürmer (*Agrotis lineatus*) und Blattläuse (wie z.B. Haferblattlaus *Rhopalosiphum padi*, Grosse Getreideblattlaus *Sitobion avenae*).

#### 4.2 Nematoden:

15 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 7 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

20

Tabelle 7: Parasitäre Nematoden

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	<i>Dolichodorus</i> spp., <i>D. heterocephalus</i>
Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
Burrowing	<i>Radopholus similis</i>
Haferzystenälchen	<i>Heterodera avenae</i> , <i>H. zeae</i> , <i>Punctodera chalcoensis</i>
Dagger	<i>Xiphinema</i> spp., <i>X. americanum</i> , <i>X. mediterraneum</i>
False root-knot	<i>Nacobbus dorsalis</i>
Lance, Columbia	<i>Hoplolaimus columbus</i>
Lance	<i>Hoplolaimus</i> spp., <i>H. galeatus</i>
Lesion	<i>Pratylenchus</i> spp., <i>P. brachyurus</i> , <i>P. crenatus</i> , <i>P. hexincisus</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. penetrans</i> , <i>P. scribneri</i> , <i>P. thornei</i> , <i>P. zeae</i>
Needle	<i>Longidorus</i> spp., <i>L. brevianulatus</i>
Ring	<i>Criconemella</i> spp., <i>C. ornata</i>
Wurzelgallenälchen	<i>Meloidogyne</i> spp., <i>M. chitwoodi</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
Spiral	<i>Helicotylenchus</i> spp.
Sting	<i>Belonolaimus</i> spp., <i>B. longicaudatus</i>

Schädigung	Pathogene Nematode
Stubby-root	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.
Stunt	Tylenchorhynchus dubius

Ganz besonders bevorzugt sind *Globodera rostochiensis* und *G. pallida* (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), *Heterodera schachtii* (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), *Heterodera avenae* (Haferzystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), *Ditylenchus dipsaci* (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), *Anguina tritici* (Weizenälchen, Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), *Meloidogyne hapla* (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel, Zuckerrübe, Luzerne).

Als für die einzelnen Sorten bevorzugte Pilz- oder Virus-Pathogene sind beispielsweise zu nennen:

15

1. Gerste:

Pilz-, bakterielle und virale Pathogene: *Puccinia graminis* f.sp. *hordei*, *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *hordei*, *barley yellow dwarf virus* (BYDV).

20

Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon*; *Schizaphis graminum*; *Blissus leucopterus leucopterus*; *Acrosternum hilare*; *Euschistus servus*; *Deliaplatura*; *Mayetiola destructor*; *Petrobia latens*.

25

2. Sojabohne:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis sojae*), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, *Pseudomonas syringae* p.v. *glycinea*, *Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli*, *Microsphaera diffussa*, *Fusarium semitectum*,

Phialophora gregata, Sojabohnen Mosaikvirus, Glomerella  
glycines, Tobacco Ring spot virus, Tobacco Streak virus,  
Phakopsorapachyrhizi, Pythium aphanidermatum, Pythium ultimum,  
Pythium debaryanum, Tomato spotted wilt virus, Heterodera  
5 glycines Fusarium solani.

Pathogene Insekten / Nematoden: Pseudoplusia includens;  
Anticarsia gemmatalis; Plathypena scabra; Ostrinia nubilalis;  
Agrotis ipsilon; Spodoptera exigua; Heliothis virescens;  
10 Helicoverpa zea; Epilachna varivestis; Myzus persicae; Emoasca  
fabae; Acrosternum hilare; Melanoplus femur-rubrum; Melanoplus  
differentialis; Hylemya platura; Sericothrips variabilis; Thrips  
tabaci; Tetranychus turkestanii; Tetranychus urticae;

15 3. Raps:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Albugo candida*,  
*Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia*  
solani, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassiccola*,  
20 *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*,  
*Alternaria alternata*.

4. Alfalfa:

25 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Clavibacter*  
*michiganense* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium*  
*irregulare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium*  
*aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora*  
30 *trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora*  
*medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrichila*  
*medicaginis*, *Fusarium*, *Xanthomonas campestris* p.v. *alfalfae*,  
*Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium*  
alfalfae.

35 5. Weizen:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Pseudomonas syringae*  
p.v. *atrofaciens*, *Urocystis agropyri*, *Xanthomonas campestris*  
p.v. *translucens*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Alternaria*  
40 *alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium*  
*avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta*  
*tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Collotetrichum graminicola*,  
*Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp.  
*tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*,

Pyrenophora tritici-repentis, Septoria (Stagonospora) nodorum,  
Septoria tritici, Septoria avenae, Pseudocercosporaella  
herpotrichoides, Rhizoctonia solani, Rhizoctonia cerealis,  
Gaeumannomyces graminis var. tritici, Pythium aphanidermatum,  
5 Pythium arrhenomanes, Pythium ultimum, Bipolaris sorokiniana,  
Barley Yellow Dwarf Virus, Brome Mosaic Virus, Soil Borne Wheat  
Mosaic Virus, Wheat Streak Mosaic Virus, Wheat Spindle Streak  
Virus, American Wheat Striate Virus, Claviceps purpurea,  
Tilletia tritici, Tilletia laevis, Ustilago tritici, Tilletia  
10 indica, Rhizoctonia solani, Pythium arrhenomanes, Pythium  
gramicola, Pythium aphanidermatum, High Plains Virus, European  
Wheat Striate Virus, Puccinia graminis f.sp. tritici (Wheat stem  
rust), Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. tritici (Wheat Powdery  
Mildew)

15 Pathogene Insekten / Nematoden: Pseudaletia unipunctata;  
Spodoptera, frugiperda; Elasmopalpus lignosellus; Agrotis  
orthogonia; Elasmopalpus Zignosellus; Oulema melanopus; Hypera  
punctata; Diabrotica undecimpunctata howardi; Russian wheat  
aphid; Schizaphis graminum; Macrosiphum avenae; Melanoplus  
femur-rubrum; Melanoplus differentialis; Melanoplus sanguinipes;  
Mayetiola destructor; Sitodiplosis mosellana; Meromyza  
americana; Hylemya coarctata; Frankliniella fusca; Cephus  
cinctus; Aceria tulipae;

25 6. Sonnenblume:  
Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Plasmophora halstedii,  
Sclerotinia sclerotiorum, Aster Yellows, Septoria helianthi,  
30 Phomopsis helianthi, Alternaria helianthi, Alternaria zinniae,  
Botrytis cinerea, Phoma macdonaldii, Macrohomina phaseolina,  
Erysiphe cichoracearum, Rhizopus oryzae, Rhizopus arrhizus,  
Rhizopus stolonifer, Puccinia helianthi, Verticillium dahliae,  
Erwinia carotovorum p.v. Carotovora, Cephalosporium acremonium,  
35 Phytophthora cryptogea, Albugo tragopogonis.

Pathogene Insekten / Nematoden: Suleima helianthana; Homoeosoma  
electellum; zygogramma exclamationis; Bothyrus gibbosus;  
Neolasioptera murtfeldtiana;

40 7. Mais:  
Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Fusarium moniliforme  
var. subglutinans, Erwinia stewartii, Fusarium moniliforme,

Gibberella zae (Fusarium graminearum), Stenocarpella maydi (Diplodia maydis), Pythium irregularare, Pythium debaryanum, Pythium graminicola, Pythium splendens, Pythium ultimum, Pythium aphanidermatum, Aspergillus flavus, Bipolaris maydis O, T 5 (Cochliobolus heterostrophus), Helmintosporium carbonum I, II & III (Cochliobolus carbonum), Exserohilum turcicum I, II & III, Helmintosporium pedicellatum, Physoderma maydis, Phyllosticta maydis, Kabatiella maydis, Cercospora sorghi, Ustilago maydis, Puccinia sorghi, Puccinia polysora, Macrophomina phaseolina, 10 Penicillium oxalicum, Nigrospora oryzae, Cladosporium herbarum, Curvularia lunata, Curvularia inaequalis, Curvularia pallens, Clavibacter michiganense subsp. nebraskense, Trichoderma viride, Maize Dwarf Mosaic Virus A & B, Wheat Streak Mosaic Virus, Maize Chlorotic Dwarf Virus, Claviceps sorghi, Pseudonomas avenae, 15 Erwinia chrysanthemi p.v. Zea, Erwinia corotovora, Cornstunt spiroplasma, Diplodia macrospora, Sclerotinia macrospora, Peronosclerospora sorghi, Peronosclerospora philippensis, Peronosclerospora maydis, Peronosclerospora sacchari, Spacelotheca reiliana, Physopella zae, Cephalosporium maydis, 20 Cephalosporium acremonium, Maize Chlorotic Mottle Virus, High Plains Virus, Maize Mosaic Virus, Maize Rayado Fino Virus, Maize Streak Virus (MSV, Maisstrichel-Virus), Maize Stripe Virus, Maize Rough Dwarf Virus.

25 Pathogene Insekten / Nematoden: Ostrinia nubilalis; Agrotis ipsilon; Helicoverpa zea; Spodoptera frugiperda; Diatraea grandiosella; Elasmopalpus lignosellus; Diatraea saccharalis; Diabrotica virgifera; Diabrotica longicornis barbieri; Diabrotica undecimpunctata howardi; Melanotus spp.; Cyclocephala borealis; 30 Cyclocephala immaculata; Popillia japonica; Chaetocnema pulicaria; Sphenophorus maidis; Rhopalosiphum maidis; Anuraphis maidiradicis; Blissus leucopterus leucopterus; Melanoplus femur-rubrum; Melanoplus sanguinipes; Hylemya platura; Agromyza parvicornis; Anaphothrips obscurus; Solenopsis milesta; 35 Tetranychus urticae.

#### 8. Sorghum:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Exserohilum turcicum, 40 Colletotrichum graminicola (Glomerella graminicola), Cercospora sorghi, Gloeocercospora sorghi, Ascochyta sorghina, Pseudomonas syringae p.v. syringae, Xanthomonas campestris p.v. holcicola, Pseudomonas andropogonis, Puccinia purpurea, Macrophomina phaseolina, Perconia circinata, Fusarium moniliforme, Alternaria

alternate, Bipolaris sorghicola, *Helminthosporium sorghicola*, *Curvularia lunata*, *Phoma insidiosa*, *Pseudomonas avenae* (*Pseudomonas alboprecipitans*), *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora sorghicola*, *Phyllachara sacchari*, *Sporisorium reilianum*

5      (*Sphacelotheca reiliana*), *Sphacelotheca cruenta*, *Sporisorium sorghi*, *Sugarcane mosaic H*, *Maize Dwarf Mosaic Virus A & B*, *Claviceps sorghi*, *Rhizoctonia solani*, *Acremonium strictum*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*,  
10     *Peronosclerospora philippinensis*, *Sclerospora graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*.

Pathogene Insekten / Nematoden: *Chilo partellus*; *Spodoptera frugiperda*; *Helicoverpa zea*; *Elasmopalpus lignosellus*; *Feltia subterranea*; *Phyllophaga crinita*; *Eleodes*, *Conoderus* und *Aeolus* spp.; *Oulema melanopus*; *Chaetocnema pulicaria*; *Sphenophorus maidis*; *Rhopalosiphum maidis*; *Siphaf lava*; *Blissus leucopterus leucopterus*; *Contarinia sorghicola*; *Tetranychus cinnabarinus*; *Tetranychus urticae*.

20     9. Baumwolle:

Pathogene Insekten / Nematoden: *Heliothis virescens*; *Helicoverpa zea*; *Spodoptera exigua*; *Pectinophora gossypiella*; *Anthonomus grandis grandis*; *Aphis gossypii*; *Pseudatomoscelis seriatus*; *Trialeurodes abutilonea*; *Lygus lineolaris*; *Melanoplus femur-rubrum*; *Melanoplus differentialis*; *Thrips tabaci* (onion thrips); *Frankliniella fusca*; *Tetranychus cinnabarinus*; *Tetranychus urticae*;

30     10. Reis:

Pathogene Insekten / Nematoden: *Diatraea saccharalis*; *Spodoptera frugiperda*; *Helicoverpa zea*; *Colaspis brunnea*; *Lissorhoptrus oryzophilus*; *Sitophilus oryzae*; *Nephrotettix nigropictus*; *Blissus leucopterus leucopterus*; *Acrosternum hilare*.

11. Raps:

40     Pathogene Insekten / Nematoden: *Brevicoryne brassicae*; *Phyilotreta cruciferae*; *Mamestra configurata*; *Plutella xylostella*; *Delia* ssp..

"BI1-Protein" meint im Rahmen der Erfindung Polypeptide die mindestens eine Sequenz die eine Homologie von mindestens 50%, bevorzugt mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90%, ganz besonders bevorzugt 100% aufweisen zu einem BI1-

5 Konsensusmotiv ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) H(L/I)KXVY
- b) AXGA(Y/F)XH
- c) NIGG
- 10 d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR
- e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL
- f) DP(S/G)(L/I)(I/L)
- g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T)
- h) YL(Y/F)LGG, bevorzugt EYLYLGG
- 15 i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W
- j) DTGX(I/V)(I/V)E

Besonders bevorzugt ist dabei das BI- Konsensusmotiv f)  
YL(Y/F)LGG, ganz besonders bevorzugt (EYLYLGG). Dieses Motiv ist  
20 charakteristisch für pflanzliche BI1-Proteine.

Besonders bevorzugt kommen Sequenzen mit Homologie zu mindestens 2 oder 3 dieser Motive (a bis g) in einem BI1-Protein vor, ganz  
25 besonders bevorzugt mindestens 4 oder 5, am meisten bevorzugt alle Motive a bis j. Weitere BI1 typischen Sequenzmotive kann der Fachmann unschwer aus dem Sequenzvergleich von BI1-Proteine - wie in Fig. 1 oder 6 dargestellt - ableiten.

30 Insbesondere bevorzugt sind BI-Proteine, die kodiert werden durch ein Polypeptid das mindestens eine Sequenz umfaßt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 und 32, und
- 35 b) Sequenzen, die eine Identität von mindestens 50%, bevorzugt mindstens 70%, besonders bevorzugt mindstens 90%, ganz besonders bevorzugt mindstens 95% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 und 32 aufweisen,
- 40 c) Sequenzen die mindestens eine Teilsequenz von mindestens 10, bevorzugt 20, besonders bevorzugt 50 zusammenhängenden Aminosäureresten einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4,

6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 und 32  
umfassen.

Erfindungsgemäß von dem Begriff BI-Protein umfaßt sind  
5 insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der BI1-  
Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 und 10 sowie homologe  
Polypeptide aus anderen Organismen, bevorzugt Pflanzen, welche  
weiterhin im wesentlichen gleiche Eigenschaften aufweisen.  
10 Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen,  
Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste.  
Umfaßt sind insofern auch Ausführungsformen unter Verwendung von  
BI1-Proteinen aus nicht-pflanzlichen Organismen wie  
beispielsweise Mensch (GenBank Acc.-No.: P55061), Ratte (GenBank  
Acc.-No.: P55062) oder Drosophila (GenBank Acc.-No.: Q9VSH3).

15 Zwischen pflanzlichen und nicht-pflanzlichen BI1-Proteinen  
konservierte Motive können durch Sequenzvergleiche leicht  
identifiziert werden (vgl. Alignment in Bolduc et al. (2003)  
Planta 216:377-386; Fig. 1 und 6).

20 Somit werden beispielsweise auch solche Polypeptide durch die  
vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation  
eines Polypeptides gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 und 10 erhält.

Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten BI1-Sequenzen  
25 homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen können z.B. durch

a) Datenbanksuche in Banken von Organismen, deren genomische  
oder cDNA Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, unter  
Verwendung der bereitgestellten BI1-Sequenzen als Suchsequenz

30 oder

b) Durchmustern von Gen- oder cDNA-Bibliotheken unter Verwendung  
der bereitgestellten BI1-Sequenzen als Sonde -

35 aufgefunden werden. Die Durchmusterung von cDNA- oder  
genomischen Bibliotheken (beispielsweise unter Verwendung einer  
der unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23,  
25, 27, 29 und 31 beschriebene Nukleinsäuresequenzen oder Teilen  
derselben als Sonde), ist ein dem Fachmann geläufiges Verfahren,  
40 um Homologe in anderen Arten zu identifizieren. Dabei haben die  
von den Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9,  
11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 und 31 abgeleiteten  
Sonden eine Länge von mindestens 20 bp, bevorzugt mindestens 50  
bp, besonders bevorzugt mindestens 100 bp, ganz besonders

bevorzugt mindestens 200 bp, am meisten bevorzugt mindestens 400 bp. Für die Durchmusterung der Bibliotheken kann auch ein zu den unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 und 31 37 beschriebenen Sequenzen komplementärer DNA-

5 Strang eingesetzt werden.

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des 10 Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

15	Gap Weight: 50	Length Weight: 3
	Average Match: 10	Average Mismatch: 0
20	Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.	
25	Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:	
30	Gap Weight: 8	Length Weight: 2
35	Average Match: 2,912	Average Mismatch: -2,003
40	Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.	

BI1-Proteine umfassen auch solche Polypeptide die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 oder 31 beschriebenen

5 BI1 Nukleinsäuresequenz, der zu ihr komplementären Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vorgenannten hybridisieren und die gleichen wesentlichen Eigenschaften wie die unter SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 und 10 beschriebenen Proteine haben.

10 Der Begriff "Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage,

15 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben. Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrifftes ausgewählt

20 sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0.2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7.0). Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschrifftes von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr

25 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch 30 denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50% Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

35 "Wesentliche Eigenschaften" meint in Bezug auf ein BI-Protein beispielsweise eine oder mehr nachfolgender Eigenschaften:

- a) Verleihung oder Steigerung der Pathogenresistenz gegen zum mindesten ein Pathogen bei Erhöhung Proteinmenge oder Funktion des besagten BI-Proteins in mindestens einem Gewebe der Pflanze, wobei besagtes Gewebe nicht die Blattempidermis ist.
- 40 b) Ausbleiben eines spontan-induzierten Zelltodes bei Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion des besagten BI-Proteins

c) Die Eigenschaft bei transienter co-Transfektion von Bax mit besagtem BI1-Protein beispielsweise in HEK293 Zellen die BAX-induzierte Apoptose signifikant zu inhibieren.

5 Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Bolduc N et al. (2003) Planta 216:377-386).

d) Das Vorliegen von fünf bis sieben putativen Transmembrandomänen innerhalb der besagten BI1-Proteins.

10 e) Eine präferentielle Lokalisation in Zellmembranen, insbesondere der Kernhüll-, ER- und/oder Thylakoidmembran.

15 Dabei kann die quantitative Ausprägung besagter Eigenschaften eines BI1-Proteins nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Wert erhalten für das BI1-Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 oder 10 abweichen.

20 Der Begriff "Erhöhung der BI1 Proteinmenge oder Funktion" ist im Rahmen dieser Erfindung breit zu verstehen und kann auf unterschiedlichen zellbiologischen Mechanismen beruhen.

25 "Proteinmenge" meint die Menge eines BI1-Proteins in dem jeweils angegebenen Organismus, Gewebe, Zelle oder Zellkompartiment.

30 "Erhöhung der Proteinmenge" meint die mengenmäßige Erhöhung der Menge eines BI1-Proteins in dem jeweils angegebenen Organismus, Gewebe, Zelle oder Zellkompartiment. - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht

35 angewendet wurde, aber unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Die Erhöhung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 30 % oder mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 % oder 100 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 200 % oder 500 %, am meisten bevorzugt um mindestens 1000 %. Die Bestimmung

40 der Proteinmenge kann durch verschiedene dem Fachmann geläufige Verfahren erfolgen. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien zu nennen: Das Mikro-Biuret Verfahren (Goa J (1953) Scand J Clin Lab Invest 5:218-222), die Folin-Ciocalteu-Methode (Lowry OH et al. (1951) J Biol Chem 193:265-275) oder die Messung der Adsorption von CBB G-250 (Bradford MM (1976) Analyt Biochem 72:248-254). Ferner kann eine Quantifizierung über immunologische Methoden wie beispielsweise Western-Blot

erfolgen. Die Herstellung entsprechender BI1-Antikörper sowie die Durchführung von BI1-Western-Blots ist beschrieben (Bolduc et al. (2002) FEBS Lett 532:111-114). Eine indirekte Quantifizierung kann über Northern-Blots realisiert werden, wobei die mRNA Menge in der Regel gut mit der resultierenden Proteinmenge korreliert. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (u.a. Bolduc et al. (2003) Planta 216:377-386; Matsumura H et al. (2003) Plant J 33:425-434).

10 "Funktion" meint bevorzugt die Eigenschaft eines BI1-Proteins den spontan-induzierten Zelltodes zu vermindern und/oder die Eigenschaft, die apoptose-indizierende Wirkung von Bax zu inhibieren. Entsprechende Funktionen zählen zu den wesentlichen Eigenschaften eines BI1-Proteins.

15 15 "Erhöhung" der Funktion meint im Rahmen dieser Erfindung beispielsweise die mengenmäßige Steigerung der inhibitorischen Wirkung auf den Bax-induzierten apoptotischen Zelltod, welche durch dem Fachmann geläufige Verfahren quantifiziert werden kann (s.o.). Der Erhöhung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 30 % oder mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 % oder 100 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 200 % oder 500 %, am meisten bevorzugt um mindestens 1000 %. Verfahren zur Erhöhung der Funktion umfassen neben den oben beschriebenen Verfahren zur Erhöhung der Proteinmenge (die auch immer die Funktion erhöht) ferner beispielhaft - jedoch nicht einschränkend - insbesondere das Einführen von Mutationen in ein BI1-Protein.

30 30 Die BI1-Proteinmenge kann beispielhaft jedoch nicht einschränkend durch eines der nachfolgenden Verfahren erhöht werden:

- 35 a) Rekombinante Expression oder Überexpression eines BI1-Proteins durch Einringen einer rekombinanten Expressionskassette umfassend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1-Protein unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.
- 40 b) Modifikation (z.B. Austausch) der regulatorischen Regionen (z.B. der Promotorregion) eines endogenen BI1-Gens beispielsweise Austausch gegen einen gewebespezifischen Promotor mittels homologer Rekombination, wobei besagter

Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.

5       c) Insertion einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII-Protein in das pflanzliche Genom hinter einen gewebespezifischen Promotor mittels homologer Rekombination, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.

10      d) Erhöhung der Expression eines endogenen BII-Proteins durch Einbringen eines Transkriptionsfaktors (z.B. eines artifiziellen Transkriptionsfaktors aus der Klasse der Zinkfingerproteine) geeignet zur Induktion der Expression besagten BII-Proteins. Bevorzugt ist das Einringen einer rekombinanten Expressionskassette umfassend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für besagten Transkriptionsfaktor unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist.

15

20      Der Begriff "Einbringen" umfaßt im Rahmen der Erfindung allgemein alle Verfahren, die dazu geeignet die einzubringende Verbindung, direkt oder indirekt, in eine Pflanze oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Samen derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfaßt. Die Einbringen kann zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz besagter Verbindung führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen) oder induzierbaren. Einführen umfaßt beispielsweise Verfahren wie

25

30      Transfektion, Transduktion oder Transformation.

35      In den im Rahmen der Erfindung zum Einsatz kommenden rekombinanten Expressionskassetten steht ein Nukleinsäuremolekül (beispielsweise kodierend für ein BII-Protein) in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem gewebespezifischen Promotor, wobei besagter Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist d.h. natürlicherweise nicht mit derselben kombiniert vorkommt. Die 40      erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten können optional weitere genetische Kontrollelemente umfassen.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung des besagten Promotors mit der zu

exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der rekombinanten Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die rekombinant zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der 10 als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der rekombinant zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 15 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare. Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer rekombinanten Expressionskassette kann mittels 25 gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular 30 Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymsschnittstellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von 35 Fusionsproteinen führen.

Bevorzugt kann die rekombinante Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

Unter einer rekombinanten Expressionskassette sind aber auch 40 solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen der Promoter - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - vor ein endogenes B11-Gen plaziert wird, und so die Expression des B11-Proteins

steuert. Analog kann auch die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz (z.B. kodierend für ein B11-Protein) derart hinter einen endogenen Promotor plaziert werden, dass der gleiche Effekt auftritt. Beide Ansätze führen zu

5 rekombinannten Expressionskassetten im Sinne der Erfindung.

Unter einem "gewebespezifischen Promotor, der im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist" sind im Rahmen dieser Erfindung allgemein solche Promotoren zu verstehen, die geeignet sind eine rekombinante Expression einer 10 Nukleinsäuresequenz mindestens in einem pflanzlichen Gewebe zu gewährleisten oder zu erhöhen, mit der Maßgabe, dass

- 15 a) besagtes pflanzliches Gewebe ausgewählt ist aus allen pflanzlichen Geweben mit Ausnahme der Blattepidermis, und
- b) die rekombinante Expression unter Kontrolle des besagten Promotors in besagtem pflanzlichen Gewebe mindestens das 20 fünfache, bevorzugt mindestens das zehnfache, besonders bevorzugt mindestens das einhundertfache der Expression in der pflanzlichen Blattepidermis beträgt.

Dem Fachmann sind zahlreiche Promotoren bekannt, die diesen Anforderungen genügen. Insbesondere geeignet sind 25 gewebespezifische Promotoren, wie beispielsweise, jedoch nicht einschränkend Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Blüten, Stengel, Wurzeln, Knollen oder Samen.

- 30 a) Als Samen spezifische Promotoren bevorzugt sind zum Beispiel die Promotoren des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol Gen Genet 215(2):326-331) und Legumin B4 (LeB4; Baumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225:121-128; Baumlein H et al. (1992) Plant J 2(2):233-9; 35 Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), USP (unknown seed protein; Baumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), Napins (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519), Saccharosebindeproteins 40 (WO 00/26388), Oleosins (WO 98/45461), oder der Bce4-Promoter aus Brassica (WO 91/13980). Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, das Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase) oder

die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben.

5 Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens). Weitere samenspezifische Promotoren sind beschrieben in WO 89/03887.

10

b) Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Promotor des Patatin Gens (GenBank Acc.-No.: A08215), den Patatin Promotor Klasse I (GenBank Acc.-No.: X14483) oder den Promotor B33-Promotor (GenBank Acc.-No.: X14483) oder den Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor beschrieben durch SEQ ID NO: 29. Knollen-spezifische Promotoren sind im Rahmen der Erfindung insbesondere zum Erzielen einer Resistenz gegen *Phytophthora infestans* geeignet. Da obligat-biotrophe Pilze nur Blätter befallen, ist eine Aktivität im epidermalen Knallengewebe unerheblich.

15

20

25

c) Blütenspezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder den Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593).

30

d) Antheren-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor und den  $\gamma$ -Zein Promotor.

35

e) Ährenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der in US 6,291,666. Ähren-spezifische Promotoren sind insbesondere zur Vermittlung einer Resistenz gegen Fusarium vorteilhaft.

40

f) Mesophyll-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Promotor des Weizen Germin 9f-3.8 Gens (GenBank Acc.-No.: M63224) oder der Gerste GerA Promotor (WO 02/057412). Besagte Promotoren sind insbesondere vorteilhaft, da sie sowohl mesophyll-spezifisch und pathogen-induzierbar sind. Ferner geeignet ist der mesophyll-spezifische Arabidopsis CAB-2 Promotor (GenBank Acc.-No.: X15222), sowie der Zea mays PPCZm1 Promotor (GenBank Acc.-No.: X63869). Insbesondere

bevorzugt sind die Promotor beschrieben durch SEQ ID NO: 30, 31 oder 32.

5 Die in den erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten oder Vektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluß auf das Zustandekommen oder die 10 Funktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die 15 gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstreß, Abscisinsäure (Lam E & Chua NH (1991) J Biol Chem 266(26):17131-17135) und Hitzestreß (Schoffl F et al. (1989) Mol Gen Genet 217(2-3):246-53) beschrieben.

20 Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S 25 Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielsweise für 30 Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebsspezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

35 Die rekombinante Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte rekombinante Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen.

40 Auch am 3'-Ende der rekombinante zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die rekombinante zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im

Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die

5 im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalin-Synthase)-Terminator.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die

10 eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel der natürliche Promoter eines BII-Gens gegen einen der bevorzugten gewebespezifischen Promoter ausgetauscht werden. Methoden wie  
15 die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der rekombinanten Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die  
20 später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Eine rekombinante Expressionskassetten und die von ihr abgeleiteten Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluß auf  
25 Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten, Vektoren oder rekombinanten Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

30 a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbizide, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin,  
35 Hygromycin, oder Phosphinotricin etc. verleihen. Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinotricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine

Dehalogenase, die Dalapon® inaktiviert), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferase (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthas Gen (ALS), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).

15 b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784; Haseloff et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2122-2127; Reichel et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(12):5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228; Chui WL et al. (1996) Curr Biol 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques. 23(5):912-8), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859; Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414), das Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), die  $\beta$ -Galactosidase, R-Locus Gen (kodieren ein Protein, das die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der Promotoraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfstoffe oder chromogener Substrate ermöglicht; Dellaporta et al., In: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988), ganz besonders bevorzugt ist die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907).

30  
35  
40 c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322

ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

5 d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzentransformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

10 Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein 15 Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).

20 Die Einführung einer erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassette in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen), kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in 25 denen die rekombinanten Expressionskassetten enthalten sind. Die rekombinante Expressionskassette kann in den Vektor (zum Beispiel ein Plasmid) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Das entstandene Plasmid wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt 30 transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und das rekombinante Plasmid mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen.

35 Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Einführung der rekombinante Expressionskassette mittels Plasmidvektoren realisiert. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der 40 rekombinanten Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen. Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA, RNA oder Protein in die entsprechende

Wirtszelle eingebracht wird.

Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von

5 Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) *Methods Enzymol*, 185:527-537; Jenes B et al. (1993) *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, *Engineering and Utilization*, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S. 128-143 sowie in Potrykus (1991) *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol*

10 42:205-225).

So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, 15 zum Beispiel mit Polyethylenglykol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur 20 Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) *Gene* 100:247-250; Scheid et al. (1991) *Mol Gen Genet* 228:104-112; Guerche et al. (1987) *Plant Science* 52:111-116; 25 Neuhouse et al. (1987) *Theor Appl Genet* 75:30-36; Klein et al. (1987) *Nature* 327:70-73; Howell et al. (1980) *Science* 208:1265; Horsch et al. (1985) *Science* 237:1229-1231; DeBlock et al. (1989) *Plant Physiol* 91:694-701).

30 Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die 35 Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.

40 Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen

geeignet. Die Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985) Science 225: 1229f).

Werden Agrobakterien verwendet, so ist die rekombinante  
5 Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren,  
entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder  
10 Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden rekombinanten Expressionskassette verbunden.

Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren  
15 können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobacterium transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion  
20 transformierter Agrobakterien und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die  
25 Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant  
30 Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Bevan et al.  
35 (1984) Nucl Acids Res 12:8711f; Clontech Laboratories, Inc. USA). Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben (Rogers et al. (1987) Methods Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).  
40 Direkte Transformationstechniken eignen sich im Prinzip für jeden Organismus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können

verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist er erforderlich, das sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

5 Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist.

10 Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von 15 Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel für geeignete Selektionsmarker sind oben genannt. Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem 20 Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Sproß und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprößlinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden. Dem 25 Fachmann sind Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992) Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 30 verwendet. Die erhaltenen Pflanzen können in der üblichen Weise gezüchtet und/oder gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

35 Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhaft mit weiteren Verfahren die eine Pathogenresistenz (beispielsweise gegen Insekten, Pilze, Bakterien, Nematoden etc.), Streßresistenz oder eine andere Verbesserung der pflanzlichen Eigenschaften bewirken kombiniert werden. Beispiele sind u.a. genannt bei Dunwell JM 40 (2000) J Exp Bot. 51 Spec No:487-96.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Polypeptidsequenzen kodierend für B11 Protein umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30 oder 32,

5 b) Sequenzen die eine Homologie von mindestens 90%, bevorzugt mindestens 95%, besonders bevorzugt mindestens 98% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30 oder 32 aufweisen, und

10 c) Sequenzen die mindestens 10, bevorzugt mindestens 20, besonders bevorzugt mindestens 30 zusammenhängende Aminosäuren einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30 oder 32 umfassen.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen kodierend für die erfindungsgemäßen neuen Polypeptidsequenzen kodierend für BI1-Proteine. Bevorzugt sind die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 oder 31, die dazu komplementäre 20 Nukleinsäuresequenz und die durch Entartung (Degeneration) des genetischen Codes abgeleitete Sequenzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft rekombinante Expressionskassetten, die eine der erfindungsgemäßen 25 Nukleinsäuresequenzen umfassen. In den erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten ist die Nukleinsäuresequenz kodierend für das BI1-Protein aus Gerste mit mindestens einem genetischen Kontrollelement nach obiger Definition derart verknüpft, das die Expression (Transkription und ggf. 30 Translation) in einem beliebigen Organismus - bevorzugt in Pflanzen - realisiert werden kann. Dazu geeignete genetische Kontrollelemente sind oben beschrieben. Die rekombinanten Expressionskassetten können auch weitere Funktionselementen gemäß obiger Definition enthalten. Die insertierte 35 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1-Protein aus Gerste kann in sense- oder antisense-Orientierung in die Expressionskassette insertiert sein, und damit zu Expression von sense- oder antisense-RNA führen. Erfindungsgemäß sind auch rekombinante Vektoren, die die rekombinanten 40 Expressionskassetten beinhalten.

"Rekombinant" meint bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend besagte Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus

transformiert mit besagter Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommene Konstruktionen, in denen sich entweder

5

- a) die BI1 Nukleinsäuresequenz, oder
- b) eine mit der BI1 Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
- 10 c) (a) und (b)

10

15

20

25

30

35

40

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomal Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des BI1-Promotors mit dem entsprechenden BI1-Gen - wird zu einer rekombinanten Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft rekombinante Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw.- oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen. Organismus ist breit zu verstehen und meint prokaryotische und eukaryotische Organismen, bevorzugt Bakterien, Hefen, Pilze, tierische und pflanzliche Organismen. Als rekombinante Organismen bevorzugte Wirts- oder

Ausgangsorganismen sind vor allem Pflanzen gemäß der oben genannten Definition.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung  
5 der erfindungsgemäßen, rekombinanten Organismen und der von  
ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel  
bei rekombinanten pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-  
, und rekombinantes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur  
10 Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder  
Feinchemikalien.

## Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Gerste (*Hordeum vulgare*).  
5
2. SEQ ID NO: 2 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Gerste (*Hordeum vulgare*).  
10
3. SEQ ID NO: 3 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus *Arabidopsis thaliana*.  
15
4. SEQ ID NO: 4 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus *Arabidopsis thaliana*.  
20
5. SEQ ID NO: 5 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Tabak.  
25
6. SEQ ID NO: 6 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Tabak.  
30
7. SEQ ID NO: 7 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Reis.  
35
8. SEQ ID NO: 8 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Reis.  
40
9. SEQ ID NO: 9 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Raps.  
30
10. SEQ ID NO: 10 : Aminosäuresequenz kodierend für ein BII Protein aus Raps.  
45
11. SEQ ID NO: 11 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Soja.  
50
12. SEQ ID NO: 12: Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Soja.  
55
13. SEQ ID NO: 13 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Soja.  
60
14. SEQ ID NO: 14: Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BII Protein aus Soja.  
65

15. SEQ ID NO: 15 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Weizen.

5 16. SEQ ID NO: 16 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Weizen.

17. SEQ ID NO: 17 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Mais.

10 18. SEQ ID NO: 18 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Mais.

15 19. SEQ ID NO: 19 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Weizen.

20 20. SEQ ID NO: 20 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Weizen.

21. SEQ ID NO: 21 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Mais.

20

22. SEQ ID NO: 22 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Mais.

25 23. SEQ ID NO: 23 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Mais.

24. SEQ ID NO: 24 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Mais.

30

25. SEQ ID NO: 25 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Weizen.

35 26. SEQ ID NO: 26 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Weizen.

27. SEQ ID NO: 27 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Mais.

40 28. SEQ ID NO: 28 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil  
eines BI1 Protein aus Mais.

29. SEQ ID NO: 29 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den

Patatin Promotor aus Kartoffel.

30. SEQ ID NO: 30 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den  
Germin 9f-3.8 Promotor aus Weizen.

5

31. SEQ ID NO: 31 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den  
Arabidopsis CAB-2 Promotor

32. SEQ ID NO: 32 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den  
10 PPCZm1 Promotor aus Mais

33. SEQ ID NO: 33 : Nukleinsäuresequenz kodierend für  
rekombinanten Expressionsvektor pUbiBI-1

15

34. SEQ ID NO: 34 : Nukleinsäuresequenz kodierend für  
rekombinanten Expressionsvektor  
pLo114UbiBI-1

20

35. SEQ ID NO: 35 : Nukleinsäuresequenz kodierend für  
rekombinanten Expressionsvektor pOXoBI-1

36. SEQ ID NO: 36 : Nukleinsäuresequenz kodierend für  
rekombinanten Expressionsvektor  
pLo114OXoBI-1

25

Abbildungen

1. Fig. 1a-d: Vergleich von Proteinsequenzen verschiedener BI-  
30 1 Proteine aus Pflanzen. AtBI-1: Arabidopsis; BnBI-1:

Brassica napus (Raps); GmBI2: Glycine max (Soja; Variante  
1); GmBI3: Glycine max (Soja; Variante 2); HVBI-1: Hordeum  
vulgare (Gerste); NtBI-1: Nicotiana tabacum (Tabak); OsBI-1:

Oryza sativa (Reis); TaBI11: Triticum aestivum (Weizen,  
Variante 1); TaBI18: Triticum aestivum (Weizen, Variante 2);

35 TaBI5 neu: Triticum aestivum (Weizen, Variante 3); ZmBI14:  
Zea mays (Mais; Variante 1); ZmBI16: Zea mays (Mais,  
Variante 2); ZmBI33: Zea mays (Mais; Variante 3); ZmBI8: Zea  
mays (Mais; Variante 4); Consensus: Aus dem Alignment  
abgeleitete Konsensussequenz.

40

2. Fig. 2: Vektorkarte für Vektor pUbiBI-1 (Ubi: Ubiquitin-  
Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-  
Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind

ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.

3. Fig. 3: Vektorkarte für Vektor pL0114UbiBI-1 (Ubi: Ubiquitin-Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.

10 4. Fig. 4: Vektorkarte für Vektor pOxoBI-1 (Oxo: TaGermin 9f-2.8 Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.

15 5. Fig. 5: Vektorkarte für Vektor pL0114OxoBI-1 (Oxo: TaGermin 9f-2.8 Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.

20 6. Fig. 6: Vergleich der Proteinssequenzen von BI-1 Proteinen aus Gerste (*Hordeum vulgare*, GenBank Acc.-No.: CAC37797), Reis (*Oryza sativa*, GenBank Acc.-No.: Q9MBD8), *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: Q9LD45) und Mensch (*Homo sapiens*, GenBank Acc.-No.: AAB87479). Schwarzhinterlegte Aminosäuren sind identisch in allen Arten. Grau hinterlegte Aminosäuren sind nur in Pflanzen identisch. Balken zeigen die vorausgesagten sieben Transmembrandomänen in HvBI-1 an.

30 7. Fig. 7: BI-1 Expression in resistenten und suszeptiblen Gersten-Linien (cDNA Gelblot-Analyse): cDNAs wurde mittels RT-PCR ausgehend von Gesamt-RNA synthetisiert. Gesamt-RNA wurde aus suszeptibler Gersten-Linie Pallas, resisterter Gersten-Linie BCP<sub>M</sub>la12 und resisterter Gersten-Linie BCP<sub>M</sub>lo5 zum Zeitpunkt 0 (d.h. unmittelbar vor Inokkulation), sowie jeweils 1, 4 und 7 Tage nach Inokkulation mit *Bgh* und parallel dazu aus nicht-infizierten Kontrollpflanzen (Ø) gewonnen. Die RT-PCR für BI-1 wurde unter Verwendung von 20 Zyklen ausgeführt (s.u.). Die eingesetzte RNA-Menge (0.5 µg) wurde zusätzlich durch rRNA-Färbung mit Ethidiumbromid in Gelen kontrolliert. Wiederholung der Experimente ergab vergleichbare Resultate.

8. Fig. 8: *BI-1* wird im Mesophyllgewebe exprimiert (cDNA Gelblot-Analyse). RT-PCR wurde ausgehend von RNA isoliert aus Pallas (P) und *BCPMLa12* (P10) (24 h nach Inokulation mit *BghA6*) durchgeführt. Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurden abaxiale epidermale Streifen (E, inoculierte Positionen der Blätter) vom Mesophyll und der adaxialen Epidermis (M) separiert. *Ubiquitin 1 (Ubi)* wurde als Marker eine gewebeunspezifischen Genexpression verwendet. RT-PCR wurde unter Verwendung von 30 Zyklen durchgeführt.

10

9. Fig. 9: *BI-1* Expression wird während chemischer Resistenzinduktion reprimiert.

15

(A) Chemisch induzierte Resistenz in der Gersten-Linie Pallas gg. *Blumeria graminis* (DC) Speer f. sp. *hordei* (*Bgh*). Gersten Primärblätter wurden mit 2,6-Dichloroisonicotinsäure (DCINA) behandelt und zeigten weniger Mehltau-Pustulen als entsprechende unbehandelte Kontrollpflanzen.

20

(B) RNA und cDNA Blots. RNA (10 µg) wurde 0, 1, 2 und 3 Tage nach Bodenbehandlung (soil drench treatment; dpt) mit DCINA bzw. der Kontrolle (Trägersubstanz) und zusätzlich 1 und 4 Tage nach Inokulation (dpi, entspricht 4 bzw. 7 dpt) analysiert. RT-PCR (*Ubi*, *BI-1*) wurde unter Verwendung von 20 Zyklen realisiert. Wiederholung führte zu vergleichbaren Ergebnissen (siehe Beispiel 2).

25

Als Kontrolle wurde BCI-4 eingesetzt. BCI-4 ist ein DCINA-induziertes Gen (Besser et al. (2000) Mol Plant Pathol. 1(5): 277-286) und ein Mitglied der Barley Chemically (=BTH) Induced- Genfamilie.

30

10. Fig. 10: Überexpression von *BI-1* induziert Supersuszeptibilität.

35

40

(A) Durchschnittliche Penetrationseffizienz von *Bgh* in 6 unabhängigen Experimenten mit *Bgh* auf Gersten-Linie Ingrid. PE von *Bgh* war signifikant ( $p<0.01$ , Students t-Test) erhöht in Zellen, die mit *pBI-1* transformiert (bombardiert) wurden im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle (*pGY1*). bombardiert wurden.

(B) Die Penetrationseffizienz von *Bgh* auf Zellen die mit einem antisense-*BI-1* Konstrukt (*pasBI-1*) bombardiert wurden,

war nicht-signifikant ( $p>0.05$ ) vermindert im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle (*pGY1*). bombardiert wurden.

5 Die Säulen geben jeweils den Mittelwert der einzelnen Experimente wieder. Die Balken stellen den Standardfehler dar.

10 11. Fig. 11: Überexpression von *BI-1* induziert Bruch der *mlo5*-vermittelten Penetrationsresistenz.  
Penetrationseffizienz von *Bgh* wurde in 3 bis 4 unabhängigen Experimenten mit *Bgh* auf den Gersten Linien Ingrid-*mlo5* bzw. Pallas-*mlo5* bewertet. PE durch *Bgh* war signifikant ( $p<0.05$ ) erhöht in Zellen, die mit *pBI-1* transformiert (bombardiert) wurden im Vergleich zu Zellen, die mit der Leervektor-Kontrolle (*pGY1*). bombardiert wurden. Die Säulen geben jeweils den Mittelwert von drei unabhängigen Experimente wieder. Die Balken stellen den Standardfehler dar.

20 12. Fig. 12: *BI-1* Expression wird durch toxische Kulturfiltrate aus *Bipolaris sorokiniana* induziert.  
Northern-Blots (10 µg Gesamt-RNA) mit RNA aus Ingrid (I) und BCIngrid-*mlo5* (I22). RNA wurde 0, 24, 48 und 72 h nach Injektion der toxischen Kulturfiltrate von *Bipolaris sorokiniana* (T) bzw. Wasser (W) isoliert. *BI-1* mRNAs wurde auf Nylonmembranen nach stringenten Waschen detektiert. *BI-1*: Detektion von BAX Inhibitor 1 mRNA; *Ubi*: Detektion von Ubiquitin 1; *Asprot*: Detection der Aspartatprotease mRNA; *hat*: Stunden nach Behandlung ("h after treatment")

30 13. Fig. 13: *BI-1* Überexpression bricht Nicht-Wirtsresistenz von Gerste (cv. Manchuria) gegen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. Penetrationsraten wurden in drei unabhängigen Experimenten untersucht.

## Beispiele

## Allgemeine Methoden:

5 Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeföhrten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen,

10 Agarosegelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al.

15 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeföhr. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. 1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

20

## Beispiel 1: Pflanzen, Pathogene und Inokulation

Die Gerstensorten Ingrid, Pallas und die rückgekreuzte Linie BCPMla12, BCPml05 und BCIIngrid-mlo5 (I22) wurde von Lisa Munk,

25 Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Dänemark zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung ist beschrieben (Kölster P et al. (1986) Crop Sci 26: 903-907).

30 Das 12 bis 36 h im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier vorgekeimte Saatgut wurde, wenn nicht anders beschrieben, zu je 5 Körnern an den Rand eines Vierkanttopfes (8x8cm) in Fruhstorfer Erde vom Typ P ausgelegt, mit Erde bedeckt und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Alle Pflanzen wurden in Klimaschränken oder -kammern bei 18°C und 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16-stündigen Licht / 8-stündigen Dunkelheitszyklus mit 3000 bzw. 5000 lux (50 bzw. 60  $\mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$  Photonenflussdichte) 5 bis 8 Tage lang kultiviert und im Keimlingsstadium in den Versuchen verwendet. Bei Experimenten, in denen Applikationen an

35 Primärblättern durchgeföhr wurden, waren diese vollständig entwickelt.

40 Vor Durchführung der transienten Transfektionsexperimente wurden die Pflanzen in Klimaschränken oder -kammern bei tagsüber 24°C,

nachts 20°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16-stündigen Licht / 8-stündigen Dunkelheitszyklus mit 30000 lux kultiviert.

5 Für die Inokulation von Gerstenpflanzen wurde echter Gerstenmehltau *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal der Rasse A6 (Wiberg A (1974) *Hereditas* 77: 89-148) (BghA6) verwendet. Dieser wurde vom Institut für Biometrie, JLU Gießen bereitgestellt. Die Nachzucht des Inokulums erfolgte in 10 Klimakammern zu den gleichen Bedingungen, wie sie oben für die Pflanzen beschrieben sind, durch Übertragung der Konidien von befallenem Pflanzenmaterial auf regelmäßige angezogene, 7 Tage alte Gerstenpflanzen cv. Golden Promise bei einer Dichte von 100 Konidien/mm<sup>2</sup>.

15 Die Inokulation erfolgte auf primäre Blätter von Gerstenpflanzen mit nachfolgenden Konidien-Dichten: 5 Konidien/ mm<sup>2</sup> bei chemischer Induktion von Resistenz und makroskopischer Auswertung des Induktionserfolges, 50 Konidien/ mm<sup>2</sup> bei 20 Genexpressionsstudien und 150 Konidien/ mm<sup>2</sup> bei Überprüfung der Gentransformation mit transformierten Blattsegmenten. Die Inokulation mit BghA6 erfolgte unter Verwendung von 25 7 Tagen alten Keimlingen durch Abschütteln der Konidien bereits befallener Pflanzen in einem Inokulationsturm (soweit nicht anders angegeben).

Beispiel 2: Modulation der BII Expression mit DCINA

2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA, Syngenta AG, Basel, Schweiz; 30 als 25% (w/w) Fomulierung) wurde auf 4-Tage alte Gerstenschößlinge der Sorte Pallas mittels Bodenbewässerung ("soil drench") in einer Endkonzentration von 8 mg/l Bodenvolumen appliziert. Die verwendete Suspension wurde mit Leitungswasser angesetzt. Als Kontrolle diente eine 35 Bodenbewässerung mit dem Trägermaterial (benetzbares Puder "wettable powder"). Nach drei Tagen wurden die Pflanzen mit *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal der Rasse A6 (5 Konidien/ mm<sup>2</sup>) infiziert. Pflanzen mit chemisch induzierter Resistenz (CIR) wiesen ca. 70% weniger 40 Mehltaukolonien auf als die entsprechenden Kontrollpflanzen, die nur mit der Trägersubstanz behandelt wurden (Fig. 9A).

Northern Blot und RT-PCT Blots wurden zur Bestimmung der BII Transkriptmengen durchgeführt und zeigten eine überraschende

Verminderung der *BI1* Expression 1 bis 3 Tage nach chemischer Behandlung (Fig. 9B).

Beispiel 3: RNA-Extraktion

5

Gesamt RNA wurde aus 8 bis 10 primären Blattsegmenten (Länge 5 cm) mittels "RNA Extraction Buffer" (AGS, Heidelberg, Germany) extrahiert. Dazu wurden die zentrale Primärblattsegment von 5 cm Länge geerntet und in flüssigem Stickstoff in Mörsern

10 homogenisiert. Das Homogenisat wurde bis zur RNA-Extraktion bei -70°C gelagert. Aus dem tiefgefrorenen Blattmaterial wurde mit Hilfe eines RNA-Extraktions-Kits (AGS, Heidelberg) Gesamt-RNA extrahiert. Dazu wurden 200 mg des tiefgefrorenen Blattmaterials in einem Mikrozentrifugenröhrlchen (2 mL) mit 1,7 mL RNA-

15 Extraktionspuffer (AGS) überschichtet und sofort gut durchmischt. Nach Zugabe von 200 µL Chloroform wurde erneut gut gemischt und bei Raumtemperatur 45 min auf einem Horizontalschüttler bei 200 U/min geschüttelt. Anschließend wurde zur Phasentrennung 15 min bei 20000 g und 4°C

20 zentrifugiert, die obere wässrige Phase in ein neues Mikrozentrifugenröhrlchen überführt und die untere verworfen. Die wässrige Phase wurde erneut mit 900 µL Chloroform gereinigt, indem 3 mal für 10 sec homogenisiert und erneut zentrifugiert (s.o.) und abgehoben wurde. Zur Fällung der RNA wurde dann

25 850 µL 2-Propanol hinzugegeben, homogenisiert und für 30 bis 60 min auf Eis gestellt. Im Anschluß daran wurde für 20 min zentrifugiert (s.o.), vorsichtig der Überstand dekantiert, 2 mL 70 %iges Ethanol (-20°C) hinzu pipettiert, durchmischt und erneut 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann wiederum

30 dekantiert und das Pelet vorsichtig mit einer Pipette von Flüssigkeitsresten befreit, bevor es an einem Reinluftarbeitsplatz im Reinluftstrom getrocknet wurde. Danach wurde die RNA in 50 µL DEPC-Wasser auf Eis gelöst, durchmischt und 5 min zentrifugiert (s.o.). 40 µl des Überstandes wurden als 35 RNA-Lösung in ein neues Mikrozentrifugenröhrlchen überführt und bei -70°C gelagert.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die RNA-Lösung 1:99 (v/v) mit destilliertem Wasser verdünnt und die Extinktion (Photometer DU 7400, Beckman) bei 260 nm gemessen ( $E_{260\text{ nm}} = 1$  bei 40 µg RNA/mL). Gemäß der errechneten RNA-Gehalte wurden die Konzentrationen der RNA-Lösungen anschließend mit DEPC-Wasser auf 1 µg/µL angeglichen

und im Agarosegel überprüft.

Zur Überprüfung der RNA-Konzentrationen im horizontalen Agarosegel (1 % Agarose in 1 x MOPS-Puffer mit 0,2 µg/mL

5 Ethidiumbromid) wurde 1 µL RNA-Lösung mit 1 µL 10 x MOPS, 1 µL Farbmarker und 7 µL DEPC-Wasser versetzt, nach Ihrer Größe bei 120 V Spannung im Gel in 1 x MOPS-Laufpuffer über 1,5 h aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. Eventuelle Konzentrationsunterschiede der RNA-Extrakte wurden mit DEPC-10 Wasser ausgeglichen und die Anpassung erneut im Gel überprüft.

Beispiel 4: Klonierung der BI1 cDNA Sequenz aus Gerste

Der Volllängenklon von hvBI1 (GenBank Acc.-No.: AJ290421) umfaßt am 3'-Ende zwei Stopp-Codons und am 5'-Ende ein potentielles Start-Codon. Der ORF überspannt 247 Aminosäuren und zeigt die höchste Sequenzhomologie zu einem BI1-Gen aus Reis, Mais, Brassica napus und Arabidopsis thaliana (jeweils 86% Identität auf Nukleotidebene) sowie einem humanen BI1-Homolog (53% Ähnlichkeit) (Fig. 1 und 6). Die Aminosäuresequenz von hvBI1 umfaßt sieben potentielle Transmembrandomänen mit einer Orientierung des C-Terminus im Cytosol.

Nachfolgende Konstrukte wurden hergestellt:

25 a) Amplifikation eines 478 bp Fragment der Gerste BI1 cDNA (GenBank Acc.-No.: AJ290421)

30 BI1-sense 5'-atggacgccttctactcgacctcg-3'  
BI1-antisense 5'- gccagagcaggatcgacgcc-3'

35 b) Amplifikation eines 513 bp *Ubi* cDNA Fragment (GenBank Acc.-No.: M60175)

UBI-sense 5'-ccaagatgcagatttcgtga-3'  
UBI-antisense 5'-ttcgcgcataggtaaaagagca-3'

40 c) Amplifikation eines 871 bp Volllängen BI1 Leserahmens

BI1VL sense 5'-ggattcaacgcgagcgcaggacaagc-3'  
BI1VL antisense 5'-gtcgacgcgtgacggttatctacatg-3'

Die erhaltenen Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T mittels T-Überhang-Ligation ligiert und dienten als Ausgangsplasmide für

die Herstellung von Sonden (z.B. für Northern-Blot) bzw. dsRNA.  
Die einzelnen Konstrukte trugen die Bezeichnung pGEMT-BI1 ,  
pGEMT-BI1VL(240) und pGEMT-UBI.

5 Das BI1-Volllängenprodukt wurde aus pGEMT in die SalI-Schnittstelle des pGY-1 vektors (Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O. & Dudler, R. (1999) Mol. Plant-Microbe Interact. 12, 647-654) unter Verwendung der SalI-Schnittstelle in pGEMT und mittels der dem BI1VL antisense Primer angefügten SalI-Schnittstellen umkloniert. Vektoren mit sense (pBI-1) und antisense Orientierung (pasBI-1) wurden isoliert und resequenziert. Die Vektoren enthalten die BI-1 Sequenz unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors.

15 Beispiel 5: Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zum Nachweis von niedrigen Transkriptmengen wurde eine semi-quantitative RT-PCR unter Verwendung des "OneStep RT-PCR Kit" (Qiagen, Hilden, Germany) durchgeführt. Dabei wurde RNA (Isolation s.o.) zuerst in cDNA übersetzt (Reverse Transkription) und in einer anschließenden PCR-Reaktion mit spezifischen Primern die gesuchte cDNA amplifiziert. Um die Ausgangsmenge an Matrizen RNA abzuschätzen, wurde die Amplifikation während der exponentiellen Phase (nach 20 Zyklen) unterbrochen um Unterschiede in der Ziel-RNA wiederzuspiegeln. Die PCR Produkte wurden über ein Agarosegel aufgetrennt, denaturiert, auf Nylonmembranen geblottet und mit spezifischen, nicht-radioaktiv-markierten Sonden unter stringenten Standardbedingungen detektiert. Hybridisierung, Waschschrifte und Immunodetektion erfolgten wie unter "Northern Blot" beschrieben. Für die einzelnen Reaktionen (25 µL-Ansatz) wurden unter Verwendung des "One Step RT-PCR Kit" (Qiagen, Hilden, Deutschland) zusammengegeben:

35 1000 ng Gesamt-RNA einer bestimmten Probe  
0,4 mM dNTPs,  
jeweils 0,6 µM sense- und antisense-Primer  
0,10 µl RNase-Inhibitor  
40 1 µL Enzymmix in 1x RT-Puffer

Die cDNA-Synthese (reverse Transkription) erfolgte für 30 min bei 50°C. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 15 min bei 95°C inaktiviert, was zugleich Aktivierung der DNA-

Polymerase und Denaturierung der cDNA bewirkt. Anschließend folgt eine PCR gemäß nachfolgendem Programm: 1 min mit 94 °C; 25 Zyklen mit 1 min mit 94 °C; 1 min mit 54°C und 1 min mit 72°C; abschließend 10 min mit 72°C. Dann Lagerung bei 4°C bis zur

5 Weiterverarbeitung. Die PCR-Produkte wurden im 1xTBE-Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Für die einzelnen Ansätze wurden mit den oben angegebenen Primer-Paaren amplifiziert.

Beispiel 6: Northern-Blot Analyse

10

Zur Vorbereitung des Northern-Blottings wurde die RNA im Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Ein Teil RNA-Lösung (entsprechend 10 µg RNA) wurde dazu mit gleichem Volumen Probenpuffer (mit Ethidiumbromid) gemischt, 5 min bei 15 94°C denaturiert, 5 min auf Eis gestellt, kurz zentrifugiert und aufs Gel aufgetragen. Das 1 x MOPS-Gel (1,5 % Agarose, ultra pure) enthielt 5 Volumenprozent konzentrierte Formaldehydlösung (36,5 % [v/v]). Die RNA wurde bei 100 V 2 h lang aufgetrennt und anschließend geblottet.

20

Das Northern-Blotting erfolgte als aufwärtsgerichteter RNA-Transfer im Kapillarstrom. Das Gel wurde dazu zunächst 30 min in 25 mM Natriumhydrogen/dihydrogenphosphat-Puffer (pH 6,5) geschwenkt und zurechtgeschnitten. Ein Whatmanpapier wurde so vorbereitet, dass es auf einer horizontalen Platte auflag und auf 2 Seiten in eine Wanne mit 25 mM Natriumhydrogen/dihydrogenphosphat-Puffer (pH 6,5) ragte. Auf dieses Papier wurde das Gel aufgelegt, wobei nicht bedeckte Teile des Whatmanpapiers mit einer Plastikfolie abgedeckt wurden. Das Gel wurde dann mit einer positiv geladenen Nylonmembran (Boehringer-Mannheim) luftblasenfrei abgedeckt, wonach die Membran wiederum mit saugfähigem Papier in mehreren Lagen etwa 5 cm hoch bedeckt wurde. Das saugfähige Papier wurde noch mit einer Glasplatte und einem 100 g Gewicht beschwert. Das Blotting erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Membran wurde kurz in A. bidest. geschwenkt und zur RNA-Fixierung mit einer Lichtenergie von 125 mJ im Crosslinker (Biorad) UV-Licht bestrahlt. Die Überprüfung des gleichmäßigen RNA-Transfers auf die Membran erfolgte auf der UV-Lichtbank.

30

40 Zur Detektion von Gersten mRNA wurden 10 µg Gesamt-RNA aus jeder Probe über ein Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillartransfer auf eine positiv-geladene Nylonmembran geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem DIG-Systeme nach

Herstellerangaben unter Verwendung von Digoxigenin-markierten antisense-RNA Sonden (wie beschrieben in Hückelhoven R et al. (2001) Plant Mol Biol 47:739-748).

5 Herstellung der Sonden: Zur Hybridisierung mit den zu detektierenden mRNAs wurden mit Digoxigenin oder Fluoreszein markierte RNA Sonden hergestellt. Diese wurden durch *in vitro* Transkription eines PCR-Produktes mittels einer T7 oder SP6 RNA Polymerase mit markierten UTPs erstellt. Als Vorlage für die PCR gestützte Amplifikation dienten die oben beschriebenen 10 Plasmidvektoren pGEMT-BI1, pGEMT-UBI. Je nach Orientierung des Inserts wurden unterschiedliche RNA-Polymerasen zur Herstellung des antisense-Stranges herangezogen. Die T7-RNA-Polymerase wurde für pGEMT-BI1 verwendet, die SP6-RNA-Polymerase für pGEMT- 15 UBI. Das Insert der einzelnen Vektor wurde über PCR mit flankierenden Standard-Primern (M13 fwd und rev) amplifiziert. Die Reaktion lief dabei mit folgenden Endkonzentrationen in einem Gesamtvolumen von 50 µL PCR-Puffer (Silverstar) ab:

20 M13-fwd: 5'-GTAAAACGACGCCAGTG-3'  
M13-Rev: 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

10 % Dimethylsulfoxid (v/v)

je 2 ng/µL Primer (M13 forward und reversed)

25 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>,  
0,2 mM dNTPs,  
4 Units Taq-Polymerase (Silverstar),  
2 ng/µL Plasmid-DNA.

30 Die Amplifikation verlief in einem *Thermocycler* (Perkin-Elmer 2400) temperaturgesteuert mit nachfolgendem Temperaturprogramm: 94°C für 3 min; 30 Zyklen mit 94°C für 30 sek, 58°C für 30 sek und 72°C für 1,2 min; 72°C für 5 min; anschließend Kühlung bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung. Der Erfolg der Reaktion wurde im 35 1 %igen Agarosegel überprüft. Die Produkte wurden anschließend mit einem "High Pure PCR-Product Purification Kit" (Boehringer-Mannheim) aufgereinigt. Man erhielt etwa 40 µL Säuleneluat, das erneut im Gel überprüft und bei -20°C gelagert wurde.

40 Die RNA Polymerisation, die Hybridisierung und die Immuno-detection wurden weitestgehend nach Angaben des Herstellers des Kits zur nicht-radioaktiven RNA-Detektion durchgeführt (DIG System User's Guide, DIG-Luminescence detection Kit, Boehringer-Mannheim, Kogel et al. (1994) Plant Physiol 106:1264-1277). 4 µL

gereinigtes PCR-Produkt wurden mit 2  $\mu$ L Transskriptionspuffer, 2  $\mu$ L NTP-Markierungsmix, 2  $\mu$ L-NTP-Mix und 10  $\mu$ L DEPC-Wasser versetzt. Anschließend wurden 2  $\mu$ L der T7-RNA-Polymeraselösung zu pipettiert. Die Reaktion wurde dann 2 h bei 37°C durchgeführt und anschließend mit DEPC-Wasser auf 100  $\mu$ L aufgefüllt. Die RNA-Sonde wurde im Ethidiumbromidgel detektiert und bei -20°C gelagert.

5 Zur Vorbereitung der Hybridisierung wurden die Membranen zunächst 1 h bei 68°C in 2 x SSC (Salt, Sodiumcitrate), 0,1 % SDS-Puffer (Natriumdodecylsulfat) geschwenkt, wobei der Puffer 2 bis 3 mal erneuert wurde. Die Membranen wurden anschließend an die Innenwand auf 68°C vorgeheizter Hybridisierungsröhren angelegt und 30 min mit 10 mL *Dig-Easy*-Hybridisierungspuffer im vorgeheizten Hybridisierungsofen inkubiert. Währenddessen wurden 10  $\mu$ L Sondenlösung in 80  $\mu$ L Hybridisierungspuffer bei 94°C für 5 min denaturiert, anschließend auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Zur Hybridisierung wurde die Sonde dann in 10 mL 68°C warmem Hybridisierungspuffer überführt, und der Puffer in 15 der Hybridisierungsröhre durch diesen Sondenpuffer ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte dann ebenfalls bei 68°C über Nacht. Vor Immundetektion von RNA-RNA Hybriden wurden die Blots stringent zweimal für jeweils 20 min in 0.1 % (w/v) SDS, 0.1 x SSC bei 68°C gewaschen. Zur Immunodetektion wurden die Blots zunächst 20 zweimal für 5 min bei RT in 2 x SSC, 0,1 % SDS geschwenkt. Anschließend erfolgten 2 stringente Waschschritte bei 68°C in 25 0,1 x SSC, 0,1 % SDS für je 15 min. Die Lösung wurde anschließend durch Waschpuffer ohne Tween ersetzt. Es wurde 1 min geschüttelt und die Lösung durch Blocking-Reagenz 30 ausgetauscht. Nach weiteren 30 min Schütteln wurden 10  $\mu$ L Anti-Fluoreszein-Antikörperlösung hinzugefügt und weitere 60 min geschüttelt. Es folgten zwei 15 minütige Waschschritte in Waschpuffer mit Tween. Die Membran wurde anschließend 2 min in 35 Substratpuffer äquilibriert und nach Abtropfen auf eine Kopierfolie überführt. Auf der "RNA-Seite" der Membran wurde dann ein Gemisch aus 20  $\mu$ L CDP-Star™ und 2 mL Substratpuffer gleichmäßig verteilt. Im Anschluß wurde die Membran mit einer zweiten Kopierfolie abgedeckt und an den Rändern mit Hitze 40 luftblasenfrei und wasserdicht verschweißt. Die Membran wurde dann in einer Dunkelkammer für 10 min mit einem Röntgenfilm bedeckt und dieser anschließend entwickelt. Je nach Stärke der Lumineszenzreaktion wurde die Belichtungszeit variiert.

Wenn nicht extra gekennzeichnet waren die Lösungen im

Lieferumfang des Kits enthalten (DIG-Luminescence detection Kit, Boehringer-Mannheim). Alle anderen wurden aus folgenden Stammlösungen durch Verdünnung mit autoklaviertem, destilliertem Wasser hergestellt. Alle Stammlösungen wurden, wenn nicht anders spezifiziert, mit DEPC (wie DEPC-Wasser) angesetzt und anschließend autoklaviert.

5 - DEPC-Wasser: Destilliertes Wasser wird über Nacht bei 37°C mit Diethylpyrokarbonat (DEPC, 0,1 %, w/v) behandelt und anschließend autoklaviert

10 - 10 x MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS (Morpholin-3-propansulfonsäure), 0,05 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA, pH mit 10 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt

15 - 20 x SSC (Natriumchlorid-Natriumzitrat, Salt-Sodiumcitrate): 3 M NaClo, 0,3 M triNatriumcitrat x 2 H<sub>2</sub>O, pH mit 4 M HCl auf pH 7,0 eingestellt.

20 - 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat, Sodiumdodecylsulfate)Natriumdodecylsulfat (w/v), ohne DEPC

25 - RNA-Probenpuffer: 760 µL Formamid, 260 µL Formaldehyd, 100 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL), 80 µL Glycerol, 80 µL Bromphenolblau (gesättigt), 160 µL 10 x MOPS, 100 µL Wasser.

30 - 10 x Waschpuffer ohne Tween: 1,0 M Maleinsäure, 1,5 M NaCl; ohne DEPC, mit NaOH (fest, ca. 77 g) und 10 M NaOH auf pH 7,5 einstellen.

35 - Waschpuffer mit Tween: aus Waschpuffer ohne Tween mit Tween (0,3 %, v/v)

35 - 10 x Blockingreagenz: 50 g Blockingpulver (Boehringer-Mannheim) in 500 mL Waschpuffer ohne Tween suspendieren.

35 - Substratpuffer: 100 mM Tris (Trishydroxymethylamino-methan), 150 mM NaCl mit 4 M HCl auf pH 9,5 einstellen.

40 - 10 x Farbmarker: 50 % Glycerol (v/v), 1,0 mM EDTA pH 8,0, 0,25 % Bromphenolblau (w/v), 0,25 % Xylencyanol (w/v).

Eine BI1 Expression wurde wie beschrieben mit RT-PCR und cDNA Gelblots untersucht und ergab, dass BI1 überwiegend im

Mesophyllgewebe von Blättern exprimiert wird, während Ubiquitin konstitutiv gleichmäßig in Epidermis und Mesophyll exprimiert wird (Fig. 8).

5 Ferner ist eine Expression von BI1 als Reaktion auf Behandlung der Pflanzen mit toxischen Kulturfiltraten von Bipolaris sorokiniana zu beobachten. Primärblätter der Gerste zeigen typische nekrotische Flecke (leaf spot blotch symptoms) nach Behandlung der Pflanzen mit toxischen Kulturfiltraten von Bipolaris sorokiniana (durchgeführt wie bei Kumar et al. 2001 beschrieben). Die Blattnekrosen waren erkennbar 48 h nach Behandlung. Der beobachtete Gewebeschaden war in der Bgh-resistanten Linie BCIngrid-mlo5 (I22) deutlicher ausgeprägt als in der Elterlinie Ingrid (Mlo-Genotype, Kumar et al. 2001). Die Expression von BI1 korreliert 72 h nach Behandlung (hat) mit der Ausprägung der Blattnekrosen (Fig. 12).

Beispiel 7:

20 Die zur stabilen, mesophyll-spezifischen Überexpression wird der Oxalat-Oxidase Promoter (germin 9f-2.8) aus Weizen eingesetzt. In Gerste ist die entsprechende Oxalat-Oxidase Expression Mesophyll-spezifisch, schwach konstitutiv und Pathogen-responsiv (Gregersen PL et al. (1997) Physiol Mol Plant Pathol 51: 85-97).

25 Er kann deshalb zur Mesophyll-spezifischen Expression von BI1 genutzt werden. Zur Kontrolle wird HvBI1 unter Kontrolle des Mais-Ubiquitinpromoters (Christensen AH et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689) oder des Reis-Aktinpromoters überexprimiert (Zhang W et al. (1991) Plant Cell 3:1155-1165). Eingesetzt werden nachfolgende Konstrukte:

30

- a) pUBiBI-1 (SEQ ID NO: 33; für transiente Gerstentransformation und Weizentransformation mit Partikel Bombardement. Expression von BI-1 unter Kontrolle des Mais Ubiquitin Promotors).
- b) pLo114UbiBI-1 (SEQ ID NO: 34; erhalten durch Umlonierung der Ubi/BI-1 Expressionscassette als EcoR1-Fragment aus pUBiBI-1 in pLo114-GUS-Kan; Binärer Vektor für transiente Gerstentransformation mit *A. tumefaciens*)
- c) pOXoBI-1 (SEQ ID NO: 35; Mesophyllspezifischer TaGermin 9f-2.8 Promoter vor BI1 zur Weizentrafo über Partikelbombardement).

d) pLo114OXoBI-1 (SEQ ID NO: 36)

Es werden Wildtypgerste und Weizen sowie *mlo*-Gerste  
5 transformiert, vermehrt und geselbstet. Die Transformation von  
Gerste und Weizen erfolgt wie beschrieben (Repellin A et al.  
(2001) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 159-183): Dazu  
werden Kalli aus unreifen Weizen- (bzw. Gersten-) embryonen über  
biolistischen Gentransfer mit Mikroprojektilen transformiert.  
10 Dabei werden pUC basierte Vektoren zusammen mit Vektoren die  
Selektionsmarker tragen kotransformiert. Anschließend werden die  
Embryonen auf Selektionsmedium kultiviert und regeneriert.  
Gerste wird mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*  
transformiert. Dabei wird ein binärer Vektor auf Basis von  
15 pCambia\_1301 eingesetzt. Unreife Embryonen von Gerste werden mit  
*A. tumefaciens* cokultiviert, selektiert und anschließend  
regeneriert (Repellin A et al. (2001) Plant Cell, Tissue and  
Organ Culture 64: 159-183; Horvath H et al. (2003) Proc Natl.  
Acad Sci USA 100: 365-369; Horvath H et al. (2002) in Barley  
20 Science, eds. Slafer, G. A., Molina-Cano, J. L., Savin, R.,  
Araus, J. L. & Romagosa, J. (Harworth, New York), pp. 143-176;  
Tingay S et al. (1997) Plant J. 11: 1369-1376).

Die transgenen (rekombinanten) Gersten- und Weizenpflanzen der  
25 T1 oder T2-Generation werden auf Resistenz gegenüber  
hemibiotrophen und perthotrophen Erregern geprüft. Dazu werden  
die Blätter mit verschiedenen Pathogenen inkuliert. Als  
biotrophe Erreger werden Gerstenmehltau (*Blumeria graminis* f.sp.  
*hordei*) und Braunrost (*Puccinia hordei*) verwendet. Als Maß der  
30 Mehltauanfälligkeit wird die Pustelzahl pro Blattfläche 5-7 Tage  
nach Inkulation mit 2-5 Konidien pro mm<sup>2</sup> Blattfläche  
ausgewertet (Beßer K et al. (2000) Mol Plant Pathology 1: 277-  
286). Als hemibiotrophe Erreger werden *Bipolaris sorokiniana* n  
und *Magnaporthe grisea* verwendet. Die Inkulation erfolgt wie  
35 zuvor beschrieben (Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91: 127-  
133; Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Inter 12: 508-  
514). Als Maß für die Anfälligkeit dient die Anzahl und Größe  
der Blattläsionen 2 bis 6 Tage nach Sprühinkulation mit  
Konidien (Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133;  
40 Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Inter 12:508-514;  
Jarosch B et al. (2003) Mol Plant Microbe Inter 16:107-114.).  
Als perthotropher Erreger wird *Fusarium graminearum* verwendet.

## 64

Zur Bestimmung der Fusarium Head Blight (FHB) Typ I-Resistenz werden Weizenähren in einem frühen Blühstadium mit einer Makrokonidien-Suspension (ca.  $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ) von *Fusarium graminearum* bzw. *Fusarium culmorum* besprüht. Die inokulierten

5 Pflanzen werden für 3 Tage in eine Nebelkammer mit 25°C Lufttemperatur und 100% relativer Luftfeuchte transferriert. Danach werden die Pflanzen im Gewächshaus unter Dauerlicht bei einer Temperatur von 20°C inkubiert und die Stärke der FHB-Symptome über die Ähre hinweg nach 5, 7 und 8 Tagen evaluiert.

10 Zur Quantifizierung der Fusarium Head Blight (FHB) Typ II-Resistenz werden jeweils 10 - 20 µl Aliquots einer Makrokonidien-Suspension (ca.  $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ) von *Fusarium graminearum* bzw. *Fusarium culmorum* in einzelne, relativ zentral gelegene Ährchen von Weizenpflanzen injiziert. Die inokulierten Pflanzen werden für 3 Tage in eine Nebelkammer mit 25°C Lufttemperatur und 100% relativer Luftfeuchte transferriert. Danach werden die Pflanzen im Gewächshaus unter Dauerlicht bei einer Temperatur von 20°C inkubiert und die Ausbreitung der FHB-Symptome über die Ähre hinweg nach 7, 14 und 21 Tagen evaluiert. Die Ausbreitung der Symptome über die Ähre (das sog. Fusarium-Spreading) wird als Mass für die FHB Typ II-Resistenz genommen.

25 Vergleichsbeispiel 1: Transiente BII Expression in der Epidermis und Evaluation der Pilzpathogenentwicklung

30 Gerste cv Ingrid Blattsegmente wurden mit einer pGY-BII zusammen mit einem GFP-Expressionsvektor transformiert. Anschließend

wurden die Blätter mit Bgh inokuliert und das Ergebnis nach 48 h mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Penetration in GFP-exprimierenden Zellen wurde mittels Detektion von Haustorien in lebenden Zellen und durch Bewertung der Pilzentwicklung aufin eben diesen Zellen beurteilt. Es wurde ein 35 Verfahren zur transienten Transformation eingesetzt, das bereits für die biolistische Einführung von DNA und RNA in epidermale Zellen von Gerstenblättern beschrieben wurde (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24:895-903).

40 Für Microcarrier-Präparation wurden 55 mg Wolframpartikel (M 17, Durchmesser 1,1 µm; Bio-Rad, München) zweimal mit 1 ml autoklaviertem Destilliertem Wasser und einmal mit 1 mL

absolutem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml 50 %igem Glycerin aufgenommen (ca. 50 mg/ml Stammlösung). Die Lösung wurde mit 50%igem Glycerin auf 25 mg/ml verdünnt, vor Gebrauch gut gemischt und im Ultraschallbad suspendiert.

5

Zur Microcarrier-Beschichtung wurden pro Schuß 0,3 µg Plasmid *pGFP* (GFP unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors; Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant-Microbe Interact* 12:647-654.), 0,7 µg Leervektor *pGY* bzw. *pGY-BI1* (1 µL), 12,5 µl Wolframpartikel-Suspension (25 mg/ml; entsprechend 312 µg Wolframpartikel), 12,5 µl 1 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung (pH 10) tropfenweise unter ständigem Mischen zusammengegeben, 10 min bei RT stehengelassen, kurz zentrifugiert und 20 µl vom Überstand abgenommen. Der Rest mit den Wolframpartikel wird resuspendiert (Ultraschallbad) und ins Experiment eingesetzt.

10

15

Es wurden ca. 4 cm lange Segmente von Gerstenprimärblättern verwendet. Die Gewebe wurden auf 0,5 % Phytagar (GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe) mit 20 µg/ml Benzimidazol in

20

Petrischalen (6,5 cm Durchmesser) gelegt und direkt vor dem Partikelbeschuss an den Rändern mit einer Schablone mit einer rechteckigen Aussparung von 2,2 cm x 2,3 cm abgedeckt. Die Schalen wurden nacheinander auf den Boden der Vakuumkammer (Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12:647-54)

25

gestellt, über dem ein Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) als Diffusor auf einer Lochplatte eingeschoben war (5 cm über dem Boden, 11 cm unterhalb des Macrocarriers, s.u.), um Partikelklumpen zu zerstreuen und den Partikelstrom abzubremsen. Der oben an der Kammer angebrachte

30

Macrocarrier (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) wurde je Schuss mit 5,8 µL DNA-beschichteten Wolframpartikeln (Microcarrier, s.u.) beladen. Mit einer Membranvakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim) wurde der Druck um 0,9 bar in der Kammer reduziert und die Wolframpartikel mit 9

35

bar Heliumgasdruck auf die Oberfläche des Pflanzengewebes geschossen. Sofort danach wurde die Kammer belüftet. Zur Markierung transformierter Zellen wurden die Blätter mit dem Plasmid (*pGFP*; Vektor auf *pUC18*-Basis, CaMV 35S-Promoter/Terminator-Kassette mit insertiertem GFP-Gen; Schweizer P et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12:647-54; zur Verfügung gestellt von Dr. P. Schweizer, Institut für Pflanzenbiologie IPK, Gatersleben, Deutschland) beschossen. Vor dem Schießen eines anderen Plasmids wurde der Macrocarrier jeweils gründlich mit Wasser gereinigt. Nach vierstündiger

Inkubation nach dem Beschuß bei leicht geöffneten Petrischalen, RT und Tageslicht wurden die Blätter mit 100 Konidien/mm<sup>2</sup> des Echten Gerstenmehltaupilzes (Rasse A6; *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* Mehltau A6) inkuliert und für weitere 40 h unter

5 gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Penetration ausgewertet. Das Ergebnis (z.B. die Penetrationseffizienz, definiert als prozentualer Anteil angegriffener Zellen, die ein mit reifem Haustorium und einer Sekundärhyphae ("secondary elongating hyphae"), wurde mittels 10 Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie analysiert. Eine Inokulation mit 150 Conidia/mm<sup>2</sup> ergibt eine Angriffs frequenz von ca. 50 % der transformierten Zellen. Für jedes einzelne Experiment wurde eine minimale Anzahl von 100 Interaktionsstellen ausgewertet. 15 Transformierte (GFP exprimierende) Zellen wurden unter Anregung mit blauem Licht identifiziert. Drei verschiedene Kategorien von transformierten Zellen konnten unterschieden werden:

1. Penetrierte Zellen, die ein leicht erkennbares Haustorium beinhalteten. Eine Zelle mit mehr als einem Haustorium wurde 20 als eine Zelle gewertet.

2. Zellen, die durch ein Pilz-Appressorium zwar angegriffen wurden, aber kein Haustorium beinhalteten. Eine Zelle die mehrfach von Bgh angegriffen wurden, aber kein Haustorium 25 enthält, wurde als eine Zelle gewertet.

3. Zellen die nicht durch Bgh angegriffen sind.

30 Stomatazellen und Stomatanebenzellen wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Oberflächenstrukturen von Bgh wurden mittels Lichtmikroskopie oder Fluoreszenzfärbung des Pilzes mit 0,3 % Calcofluor (w/v in Wasser) für 30 sec analysiert. Die Entwicklung des Pilzes kann leicht durch Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit Calcofluor evaluiert werden. In BI1-dsRNA 35 transformierten Zellen entwickelt der Pilz zwar ein primäres und ein appressoriales Keimschlauch ("Germ-Tube") aber kein Haustorium. Haustoriumausbildung ist eine Vorbedingung für die Bildung einer Sekundärhyphae.

40 Die Penetrationseffizien (Penetrationsraten) errechnet sich als Anzahl der penetrierten Zellen durch Anzahl der attackierten Zellen multipliziert mit 100.

Die Penetrationseffizienz dient der Bestimmung des Suszeptibilität von Zellen, die mit pGY-BI1 transfiziert sind im Vergleich zu Zellen die mit einer Leervektorkontrolle transformiert sind (Fig. 10). Es wurde beobachtet, dass die BI1

5 Überexpression die Penetrationshäufigkeit von Bgh signifikant erhöht (Fig. 10). In sechs unabhängigen Experimenten bewirkte die Überexpression in der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid eine signifikante Erhöhung der durchschnittlichen Penetrationseffizienz (PE) von 47 % auf 72 % (165 % der 10 Kontrollen) bei Zellen die BI1 überexprimieren im Vergleich zu Zellen, die mit Leervektor transformiert wurden (Kontrolle) (Fig. 10).

Ferner wurden epidermale Zellen der Bgh-resistenten *mlo5*-Gerste 15 mit dem BI1 Überexpressionskonstrukt pGY-1 wie oben beschrieben transient transformiert. Der *mlo5*-Genotyp in einem Pallas bzw. Ingrid Hintergrund zeigt eine geringfügige Anfälligkeit gegen Bgh. In 7 unabhängigen Experimenten wurde in Kontrollpflanzen (Transformation mit Leervektor und GFP-Vektor) eine

20 Penetrationseffizienz von minimal 0 bis maximal 11 % gefunden. Überraschenderweise ergab eine BI1 Überexpression (pGY-BI1) eine nahezu vollständige Rekonstitution der suszeptiblen Phänotyps, d.h. es erfolgte ein nahezu kompletter Bruch der *mlo*-Resistenz. Die durchschnittliche Penetrationseffizienz von Bgh auf Ingrid- 25 *mlo5* und Pallas-*mlo5* Blattsegmenten steigt von 4 % auf 23 %, bzw. von 6 % auf 33 % (Fig. 11). Dies bedeutet einen relativen Anstieg der Penetration auf 520 % bzw. 510 % der Kontrollen. Des Weiteren erhöhte die Überexpression von BI1 im Gerste cv 30 *Manchuria* die Anfälligkeit gegen das Weizenpathogen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* in drei unabhängigen Experimenten von 0 bis 4 % auf 19 bis 27 % (Fig. 13).

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen  
5 mindestens einen biotischen oder abiotischen Stressfaktor in  
Pflanzen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
  - a) Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines Bax Inhibitor-1 (BI1) Proteins in mindestens einem  
10 pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert  
bleibt, und
  - b) Auswahl der Pflanzen, bei denen im Vergleich zur Aus-  
15 gangspflanze eine Resistenz gegen mindestens einen bio-  
tischen oder abiotischen Stressfaktor besteht oder er-  
höht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Stressfaktor ein pflanz-  
20 liches Pathogen ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei der  
Stressfaktor ein nekrotropes oder hemibiotropes Pathogen  
ist.  
25
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das BI-1  
Protein mindestens eine Sequenz umfasst, die eine Homologie  
von mindestens 50% aufweist zu mindestens einem BI1-  
Konsensusmotiv ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  
30
  - a) H(L/I)KXVY,
  - b) AXGA(Y/F)XH,
  - c) NIGG,
  - d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR,
  - 35 e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL,
  - f) DP(S/G)(L/I)(I/L),
  - g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T),
  - h) YL(Y/F)LGG,
  - i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W, und
  - 40 j) DTGX(I/V)(I/V)E.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das BI-  
Protein kodiert wird durch ein Polypeptid, das mindestens  
eine Sequenz umfasst ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:  
45

- a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 oder 32, und
- 5 b) Sequenzen, die eine Identität von mindestens 50% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 oder 32 aufweisen,
- 10 c) Sequenzen die mindestens eine Teilsequenz von mindestens 10 zusammenhängenden Aminosäureresten einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 oder 32 umfassen.
- 15 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines BI1-Proteins durch rekombinante Expression des besagten BI1-Proteins unter Kontrolle eines wurzel-, knollen- oder mesophyll-spezifischen Promotors realisiert wird.
- 20 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend
  - (a) stabile Transformation einer pflanzlichen Zelle mit einer rekombinanten Expressionskassette enthalten eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem gewebespezifischen Promotor, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die besagte das BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist.
- 25 30 (b) Regeneration der Pflanze aus der pflanzlichen Zelle, und
  - (c) Expression besagter für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in einer Menge und für eine Zeit hinreichend um eine Streß- und/oder Pathogenresistenz in besagter Pflanze zu erzeugen oder zu erhöhen.
- 35 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze aus den monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen ausgewählt ist.
- 40 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe der monokotyledonen Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsa-

men oder Zuckerrohr.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Pflanze einen mlo-resistenten Phänotyp aufweist.

5

11. Polypeptidsequenz kodierend für BI1 Protein umfassend mindestens eine Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

10

a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30 oder 32,

15

b) Sequenzen die eine Homologie von mindestens 90%, bevorzugt mindestens 95%, besonders bevorzugt mindestens 98% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30 oder 32 aufweisen, und

20

c) Sequenzen die mindestens 10, bevorzugt mindestens 20, besonders bevorzugt mindestens 30 zusammenhängende Aminosäuren einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30 oder 32 umfassen.

12. Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Polypeptidsequenz gemäß Anspruch 11.

25

13. Rekombinante Expressionskassette enthalten eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem gewebespezifischen Promotor, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattempidermis aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die besagte 30 das BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist.

14. Rekombinante Expressionskassette nach Anspruch 13, wobei

35

a) das BI1-Protein wie in einem der Ansprüche 4, 5 oder 11 definiert ist, und/oder

40

b) der gewebespezifische Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe der wurzel-, knollen- oder mesophyllspezifischen Promotoren.

45

15. Rekombinanter Vektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 13 oder 14.

16. Rekombinanter Organismus enthaltend mindestens eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 13 oder 14 und/oder

mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 15.

17. Rekombinanter Organismus nach Anspruch 17 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, nicht-menschlichen Tieren und Pflanzen.

5 18. Rekombinanter Organismus nach Anspruch 16 oder 17, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, 10 Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, Raps, Kresse, Arachidopsis, Kohlarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuß, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, Tagetes, Salat, Calendula, Melone, Kürbis und zucchini.

15 19. Rekombinanter Organismus nach einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei der Organismus eine Pflanze ist, die zusätzlich einen mlo-resistenten Phänotyp aufweist.

Verfahren zur Erhöhung der Resistenz gegen Stressfaktoren in Pflanzen

Zusammenfassung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens einen biotischen oder abiotischen Stressfaktor in Pflanzen, bevorzugt gegen pflanzliche Pathogene, durch Erhöhung der Expression mindestens eines Bax-Inhibitor 1 (BI1) Proteins in mindestens einem pflanzlichen Gewebe mit der Maßgabe, dass die Expression in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt. Die Erfindung betrifft ferner rekombinante Expressionskassetten und Vektoren, die eine für ein BI-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors umfassen, wobei der Promotor im wesentlichen keine Aktivität in der Blattepidermis aufweist. Die Erfindung betrifft ferner mit besagten Expressionskassetten oder Vektoren transformierte rekombinante Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder rekombinantes Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

10

15

20

1 AtBI-1 (1) -----MDAFSSFFDSQPGS---RSWSYDSLKNFRQISPQAVQNHHLKR  
 BnBI-1 (1) -----MDSFSSFFDSQPGS---RSWSYDSLKNLRQISPQSVQNHHLKR  
 GmBI2 (1) -----RLQAMDAFNSFFDS-----RNRWNYDTLKNFRQISPQVQNHHLKQ  
 GmBI3 (1) ITKTIRFDSDLFSMDTFFKSPSSSSRSRWSYDTLKNFRQISPQVQNHHLKQ  
 HVBI-1 (1) -----MDAFYSTS---SAAASGWGHDSLKNFRQISPQAVQSHLKL  
 NtBI-1 (1) -----MESCTSFFNSQSASS-RNRWSYDSLKNFRQISPQFVQTHLKK  
 OsBI-1 (1) -----MDAFYSTSSAYGAAASGWGYDSLKNFRQISPQAVQSHLKL  
 TaBI11 (1) -----  
 TaBI18 (1) -----FSGTFRNSRSDDFVLCLELQRELPRCRDATALTV  
 TaBI5 neu (1) -----VAMPGR  
 ZmBI14 (1) -----  
 ZmBI16 (1) -----  
 ZmBI33 (1) -----  
 ZmBI8 (1) -----  
 Consensus (1) F S W YDSLKN R ISP VQ HLK

100

AtBI-1 (39) VYLTLCALVASAFGAYLHVWNIGGILTTIGCIGTMIWLLSCPPYEHQK  
 BnBI-1 (39) VYLTLCALVASAFGAYLHVWNIGGILTTIGCFGSMIWLLSCPPYEQQK  
 GmBI2 (40) VYFTLCFAVVAAAVGAYLHVLLNIGGFLTTVACMGSSFWLLSTPPFEERK  
 GmBI3 (51) VYFTLCACVVAAGAFLHVWNIGGFLTTLASIGSMFWLLSTPPFEEQK  
 HVBI-1 (37) VYLTLCFALASSAVGAYLHIALNIGGMLTMLACVGTIAWMFSVPVYERK  
 NtBI-1 (41) VYLSLCALVASAAGAYLHILWNIGGLTLGCVGSIVWLMTPLYEEQK  
 OsBI-1 (40) VYLTLCVALAASAVGAYLHVVALNIGGMLTMLGCVGSIAWLFSPVFEERK  
 TaBI11 (1) -----  
 TaBI18 (33) VYVPIVGRIKSAAGAYLHIALNIGGMLTMLACIGTIAWMFSVPVYERK  
 TaBI5 neu (7) RFRLTYALPGLICRGCLPAHCPEHWRDADNARVYRNHRLDVLGASLRGEE  
 ZmBI14 (1) -----GSIAWLFSPVYERK  
 ZmBI16 (1) -----WNIGVRLTMLGCIGSIDWLFSVPVYERK  
 ZmBI33 (1) -----WNIGGTLTMLGCVGSIAWLFSPVYERK  
 ZmBI8 (1) -----  
 Consensus (51) VY TLC AL ASA GAYLHV NIGG LT LGCIGSI WL S PVYERK

150

AtBI-1 (89) RLSLLFVSAVLEGASVGPLIKVAIDVDPSSILITAFVGTAIAFVCFSAAM  
 BnBI-1 (89) RLSLLFLSAVLEGASVGPLIKVAVDFDPSILITAFVGTAIAFICFSGAAM  
 GmBI2 (90) RVTLLMAASLFQGSSIGPLIDLAIHIDPSLIFSAFVGTAIAFACFSGAAL  
 GmBI3 (101) RLSLLMASALFQGASIGPLIDLAFAIDPGLIIGAFVATSLAFACFSAVAL  
 HVBI-1 (87) RFGLLMGAALLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTIAIFGCFSGAAI  
 NtBI-1 (91) RIALLMAAALFKGASIGPLIELAIDFDPSIVIGAFVGCAVAFGCFSAAM  
 OsBI-1 (90) RFGILLAAALLEGASVGPLIKLAVDFDSSILVTAFVGTAIAFGCFTCAAI  
 TaBI11 (1) -----AAI  
 TaBI18 (83) RFGLLMGAALLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTIAIFGCFSGAAI  
 TaBI5 neu (57) EVWAADGCSLLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTIAIFACFSCAAM  
 ZmBI14 (17) RYWLLMAAALLEGASVGPLIKLAVEFDPSILVTAFVGTAIAFACFSGAAM  
 ZmBI16 (30) RYGLLMAAALLEGASVGPLVKLAVEFDPSILVTAFVGTAIAFACFSGAPW  
 ZmBI33 (30) RYGLLMAAALLEGASVGPLVKLAVEFDPSILVTAFVGTAIAFACFSGAPW  
 ZmBI8 (1) -----VIDLDSRILVTAFVGTAIAFACFSGAAI  
 Consensus (101) R LLMAAALLEGASVGPLI LAIDFDPSILVTAFVGTAIAFACFSGAAI

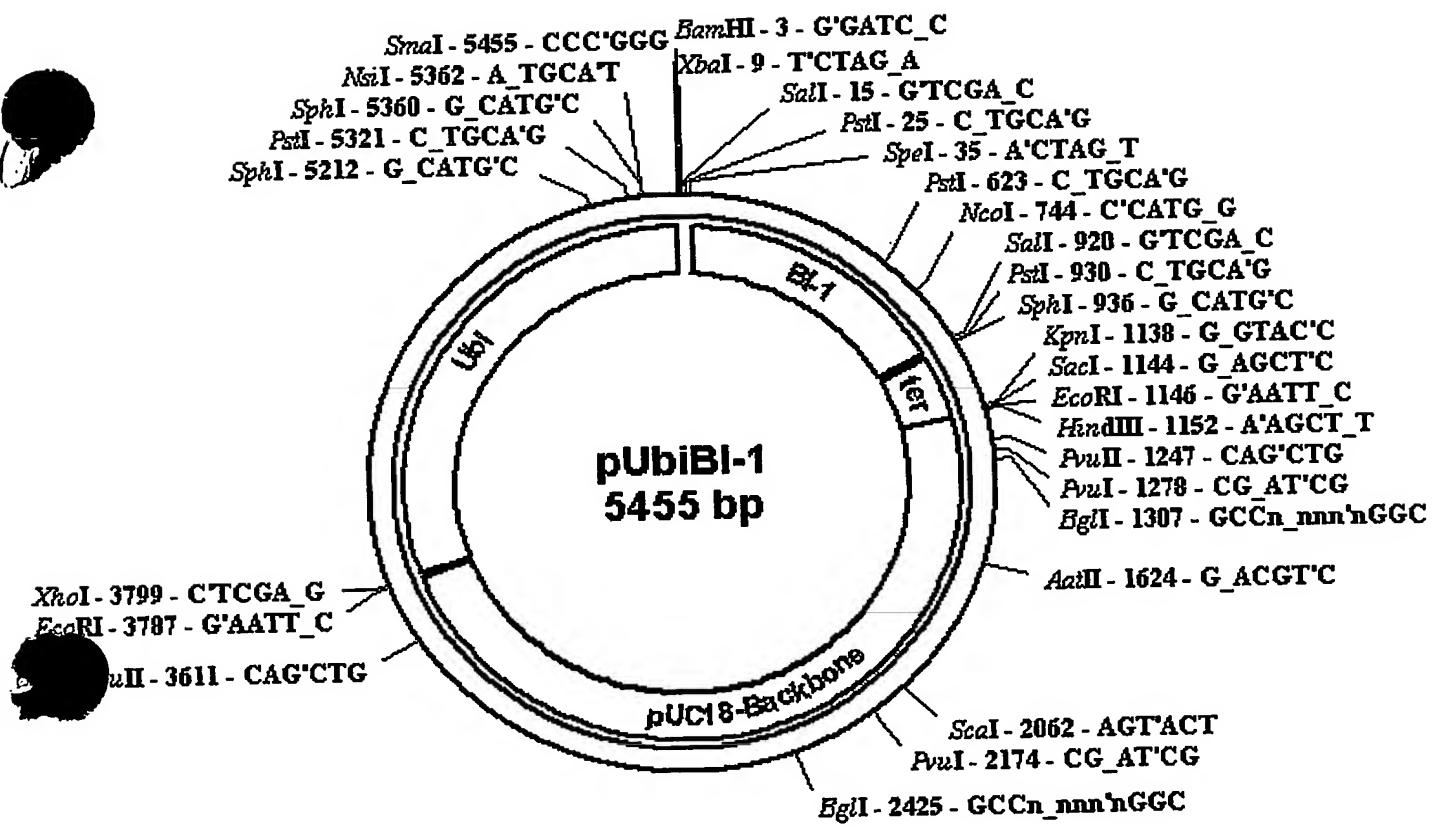
**Fig.1a**

		151	200
AtBI-1	(139)	LARRREYLYLGGLLSSGLSMLMWLQFASSIFG-GSASIFKFELYFGLLIF	
BnBI-1	(139)	LARRREYLYLGGLLSSGLSMLMWLQFASSIFG-GSASIFKFELYFGLLIF	
GmBI2	(140)	VARRREYLYLGGLVSSGLSILLWLHFASSIFG-GSTALFKFELYFGLLVF	
GmBI3	(151)	VARRREYLYLGGLLSSWLSILMWLHSDSSLFG-GSIALFKFELYFGLLVF	
HvBI-1	(137)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFVTSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
NtBI-1	(141)	VARRREYLYLGGLLSSGLSILFWLHFASSIFG-GSMALFKFEVYFGLLVF	
OsBI-1	(140)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFAASIFGHST-GSFMFEVYFGLLIF	
TaBI11	(4)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
TaBI18	(133)	IAKRREYLYLGGLLSSG-----LTIL	
TaBI5 neu	(107)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF	
ZmBI14	(67)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFAASIFGHQSTSSFMFEVYFGLLIF	
ZmBI16	(80)	VARRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQLAASIF-GHSATSFMFEVYFGLLIF	
ZmBI33	(80)	WQAR-EYLYLGGSRRGSPSCSGCSSPPSS--ALRNSFMFEVYFGLLIL	
ZmBI8	(29)	IAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHTS-ATFMFELYFGLLVF	
Consensus	(151)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFASSIFG S ASFMFEVYFGLLIF	
		201	250
AtBI-1	(188)	VGYMVVDTQEIIIEKAHLGDMDYVKHSLTLFTDFVAVFVRILIIIMLKN SAD	
BnBI-1	(188)	VGYMVVDTQDIIIEKAHLGDMDYVKHSLTLFTDFVAVFVRVLIIIMLKN SAD	
GmBI2	(189)	VGYIVVDTQEIIVERAHLGDLDYVKHALTLFTDLVAVFVRILVIMLKN STE	
GmBI3	(200)	VGYVIVDTQEIIIERAHFGDL DYVKHALTLFTDLAAIFVRILIIIMLKN SSE	
HvBI-1	(186)	LGYMYVDTQEIIIERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIIIMLKN AGD	
NtBI-1	(190)	VGYIIFDTQDIIIEKAHLGDL DYVKHALTLFTDFVAVFVRILIIIMLKN ASD	
OsBI-1	(189)	LGYMYVDTQEIIIERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRILVIMLKN ASD	
TaBI11	(53)	LGYMYVDTQEIIIERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRILIIIMLKN AGD	
TaBI18	(154)	L-----	
TaBI5 neu	(156)	LGYMYVDTQEIIIERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIIILLKNAAD	
ZmBI14	(117)	LGYMYVDTQEVIERAHHG-----	
ZmBI16	(129)	LGYVYVYDT-----	
ZmBI33	(127)	LG-----	
ZmBI8	(78)	LGYMFDTQEIIIERAHRGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRILVIMMKN AQE	
Consensus	(201)	LGYMYVDTQEIIIERAH GDMDYIKHALTLFTDFVAV VRILIIIMLKN A D	
		251	300
AtBI-1	(238)	KEEKKKRNRN-----GDVK-I-LYGCYRVWPL-RYLLALSIGDQTCF	
BnBI-1	(238)	KEDKKKRRRN----D-KVRKKAK-SGCYVCFKK-----KRVG	
GmBI2	(239)	RNEKKKKR-----	
GmBI3	(250)	RNEKKKKRND--ADRPTRAQASLQ-FSLWRIHN-----LFR-CWSLV-	
HvBI-1	(236)	KSEDKKKKRKG-----S-----	
NtBI-1	(240)	KEEKKKRNRN---CISGYSKTL-L-NLAFSCS---TSVDLRQVCC--FG	
OsBI-1	(239)	KSEEKKRKKRS-ELLFPLCT-EKTTAAIASTYYDRAALQLGFMVNTSSFA	
TaBI11	(103)	KSEDKKKKRRRS-----	
TaBI18	(155)	-----	
TaBI5 neu	(206)	KVGGQEEEEEKS-----	
ZmBI14	(135)	-----	
ZmBI16	(137)	-----	
ZmBI33	(129)	-----	
ZmBI8	(128)	KSQDEKKRK-----	
Consensus	(251)	K E KKKRR	

Fig.1b

		301		350
AtBI-1	(278)	H-KG-SACFTSAQVPSSDCK-----		LECCSSFHKLLFFKSL
BnBI-1	(269)	VISTDMIALVFFTCLSEQFW-----		QHTLRICVFLLVTPDCEWI
GmBI2	(249)	-----		
GmBI3	(288)	LVSYVFAVMVNVRISFKHLHMYLPIS-CVV-HHTLV-KKKKKKKKKKKKK		
HVBI-1	(248)	-----		
NtBI-1	(279)	NASD-AARLCYAAQCQCGYGGT-MVLF-----PKHTIK-HACLHYIDNLRVY		
OsBI-1	(287)	FC-YGVNLLRFVVVVALQILACYMTRIFL-WWSR-SKRENTSSFATNLFA		
Consensus	(301)			
		351		400
AtBI-1	(312)	VLLIASYQAKNNVKG-----SCLNFLKCVHFRKKKKKKKK		
BnBI-1	(307)	SILKLC-KLSVGS-----		
GmBI2	(249)	-----		
GmBI3	(335)	KKKKKXXXXXXXXXXXXXX--XXXXXGVCGLRYSRHSSNH-EGSLW-PGLC-		
HVBI-1	(248)	-----		
NtBI-1	(322)	YLFLLPFAVLGCS-LYS-FSVMLDHLLS-RLISHIDGRNENSHRRPNLFK		
OsBI-1	(334)	FW-LMMILSPKKKK-----		
Consensus	(351)			
		401		450
AtBI-1	(348)	-----		
BnBI-1	(319)	-----		
GmBI2	(249)	-----		
GmBI3	(380)	ACIDTVH-FGCNLICANS-YNVE-FI-EK-EEEEERLIG-PIAMCRVIWFV		
HVBI-1	(248)	-----		
NtBI-1	(369)	TEAQL-----		
Consensus	(401)			
		451		500
GmBI3	(424)	ENT-LAV-KLLVPLCS--LAMCLL-W-MSGFLLNIFICIC--S-YIV-TS		
Consensus	(451)			
		501            512		
GmBI3	(464)	FLGLKKEKKKKK		
Consensus	(501)			

**Fig.1c**



**Fig. 2**

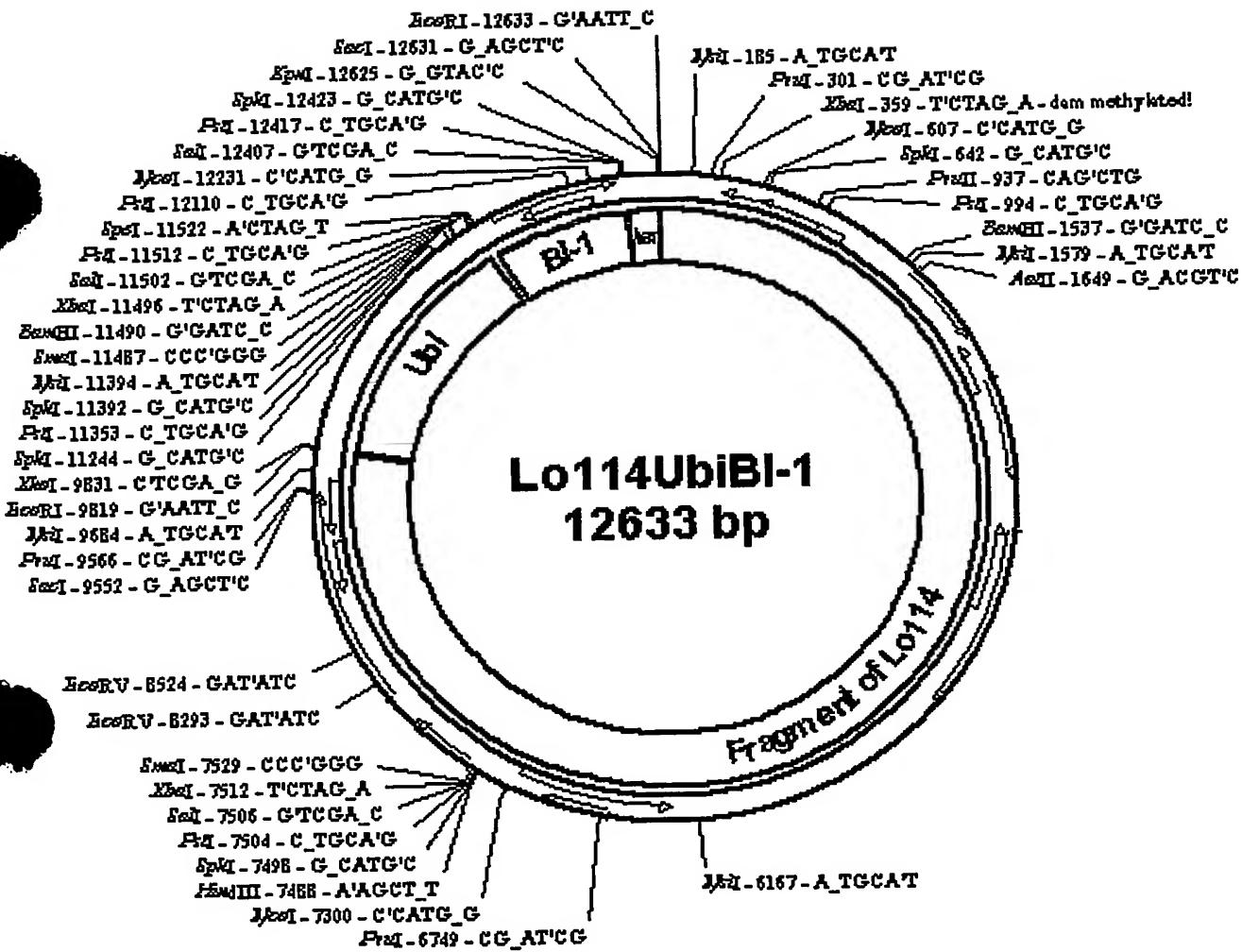


Fig. 3

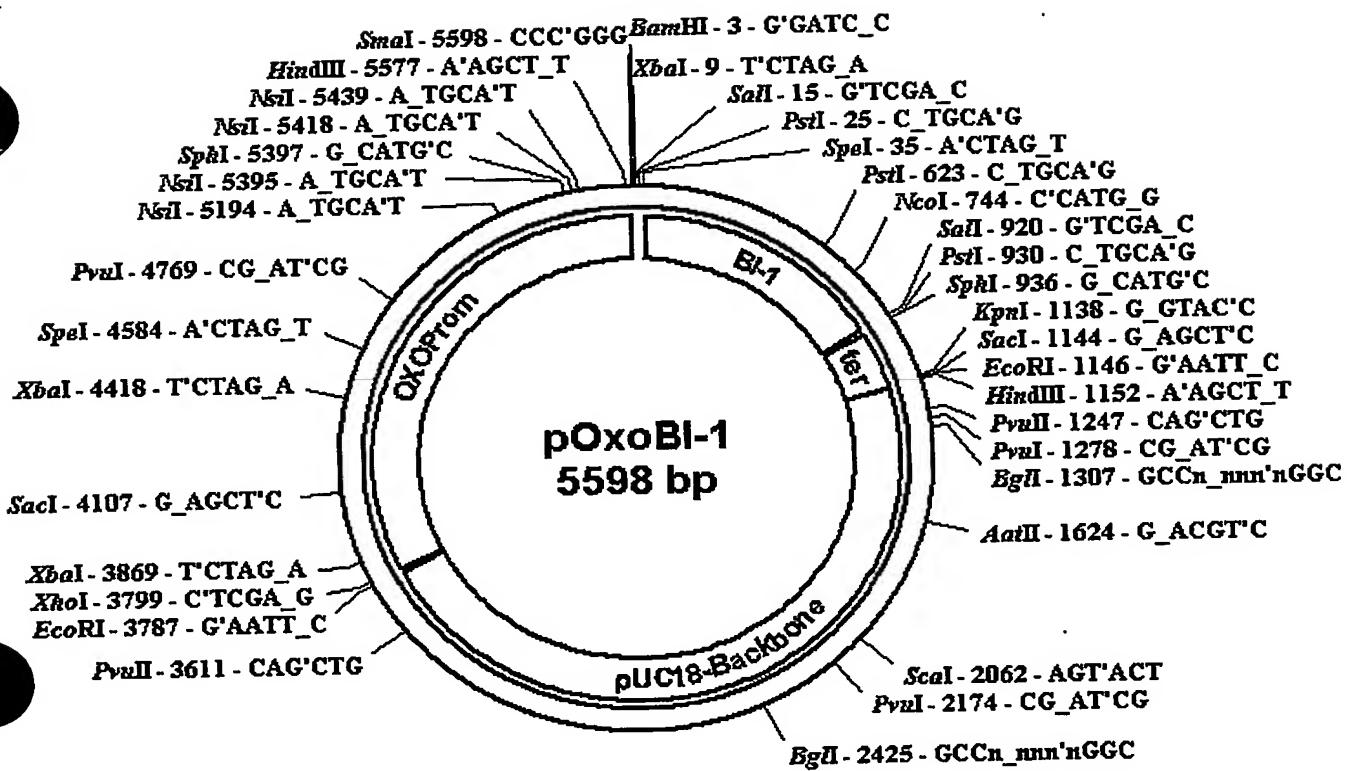
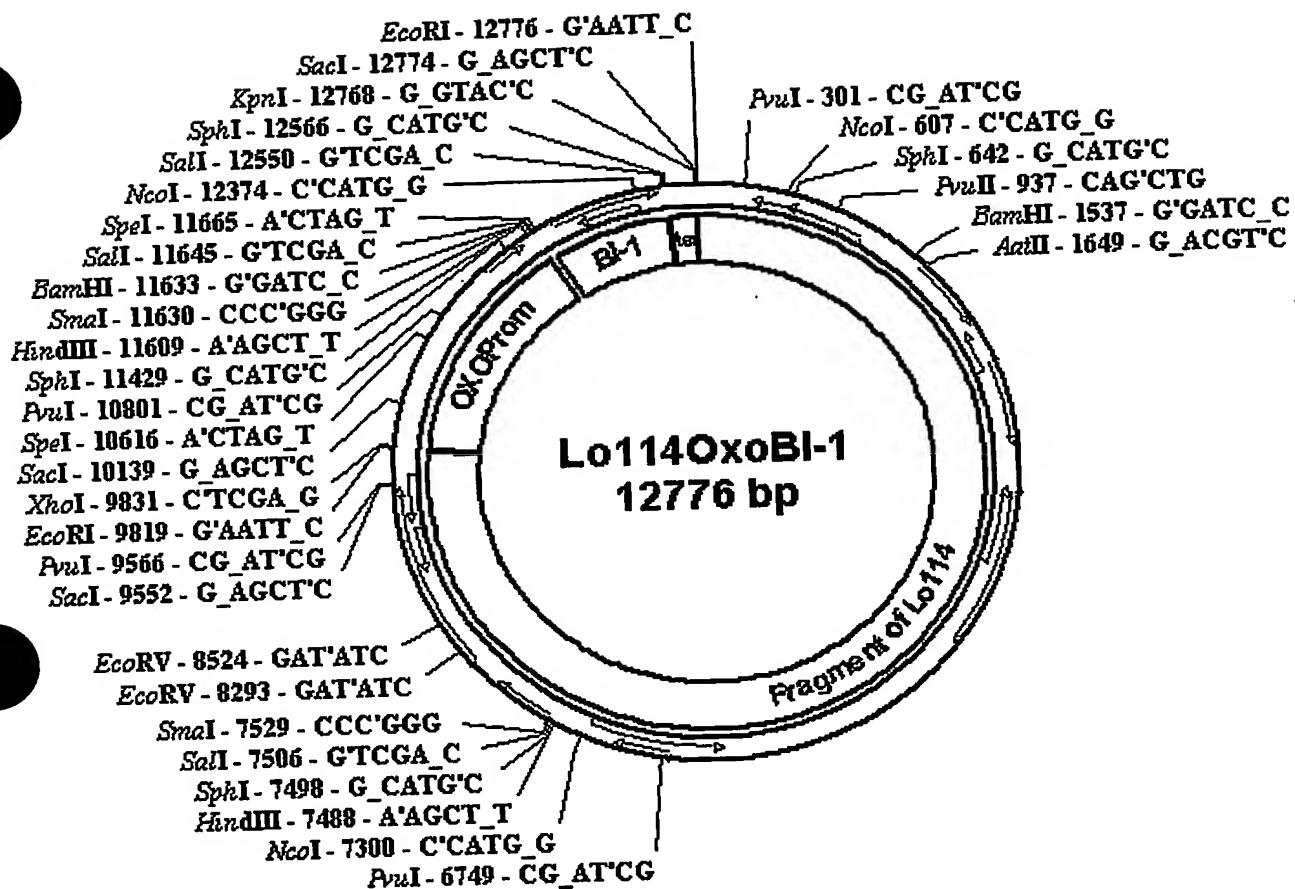


Fig. 4



**Fig. 5**

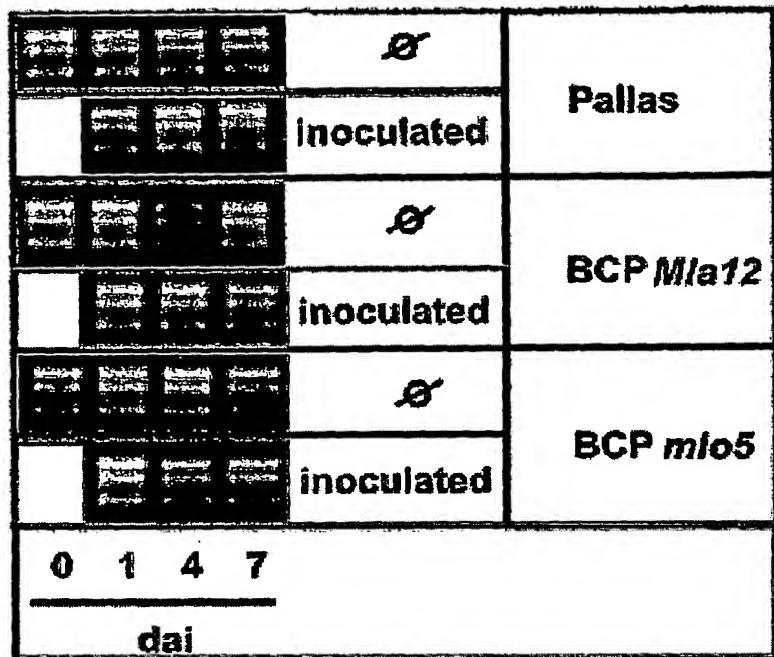
BEST AVAILABLE COPY

<i>H. vul.</i>	MDFYSTSS---AAASGNGHDSLKNFRCISPAVQSHLKLVYLTLCPALASSAVGAYLHIA	57
<i>O. sat.</i>	MDFYSTSSAYGAAASGNGYDSLKNFRCISPAVQSHLKLVYLTLCVAAASAVGAYLHVA	60
<i>A. tha.</i>	MDFSSFFDS-OPGSRSUSYDSLKNFRCISPAVQSHLKRVYLTLCCALVASAFGAYLHVL	59
<i>H. sap.</i>	MNIFDRKIN-----FDALLKFSHTIPSTCCHLKKVYASFALCMVANAGAYVHMV	50
<i>H. vul.</i>	LN---IGGELTMLACVGTIAWIFSVPVYEE--RERFGLLNGAALLEGASVGPLIELAIDFD	113
<i>O. sat.</i>	LN---IGGELTULGCVGSIAWLFSPVVFEE--RKRFGLLAAALLEGASVGPLIKLAVDFD	116
<i>A. tha.</i>	UN---IGGILTTIGCIGTMWLLSCPPYEH--QKRLSLLFVSLVLEGASVGPLIKVADVD	115
<i>H. sap.</i>	THFIQAGILSALGSLILMIMLMATEFHSHETECKELGLLAGFDFITGVGLGEALEFCIAWN	110
<i>H. vul.</i>	PSILWTVGVTATAFGCFSGEIIIMKRRREYLVLGGLLSSGLSILLWLOFVTSIFGHSSGS	173
<i>O. sat.</i>	SSILWTAFTVGTATAFGCFTCAMIVMRRREYLVLGGLLSSGLSILLWLOFAASIFGHSTGS	176
<i>A. tha.</i>	PSILITAFTVGTATAFVCFSAMIMLARRREYLVLGGLLSSGLSMILWLOFASIIFGGSASI	175
<i>H. sap.</i>	PSILPTAFTVGTAMIFTCFTLSALYERRFSYLFLLGGILMSALSLLLSSSLGNWFFG-SIWP	169
<i>H. vul.</i>	FMEEVYFGMLIFLGYIVYDTQEIIIEERHHGDDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLLIMLKWA	233
<i>O. sat.</i>	FIREVYFGLLIFLGYIVYDTQEIIIEERHHGDDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLLIMLKWA	236
<i>A. tha.</i>	FKFELYFGLLIWGVHVDTCIIIEERHHGDDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLLIMLKWS	235
<i>H. sap.</i>	FQANLIVGLVVMCGFVLVDTGLIIEKPEHGDODYIWHCIDLFLDEITDFRKLUMILAMNE	229
<i>H. vul.</i>	GDESEDKEKRKRS 247	
<i>O. sat.</i>	SDKSEKEKRKRS- 249	
<i>A. tha.</i>	ADR-EKEKKRRN- 247	
<i>H. sap.</i>	KDK---KEEKK--- 237	

Fig. 6

BEST AVAILABLE COPY

rRNAs



Bl-1

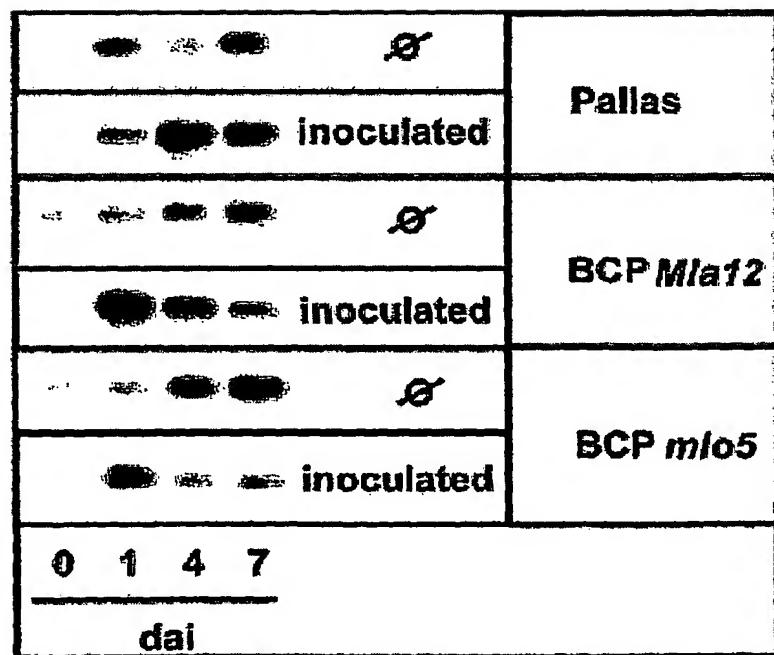


Fig. 7

BEST AVAILABLE COPY

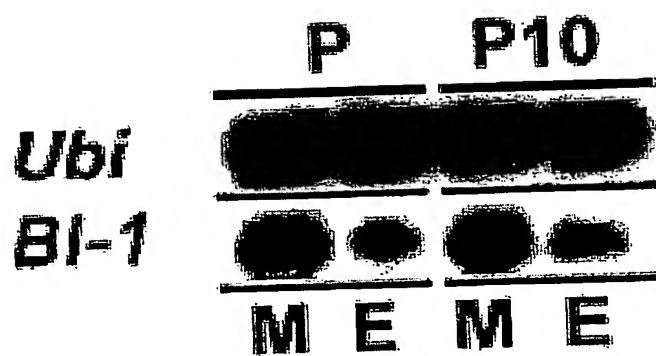


Fig. 8

BEST AVAILABLE COPY

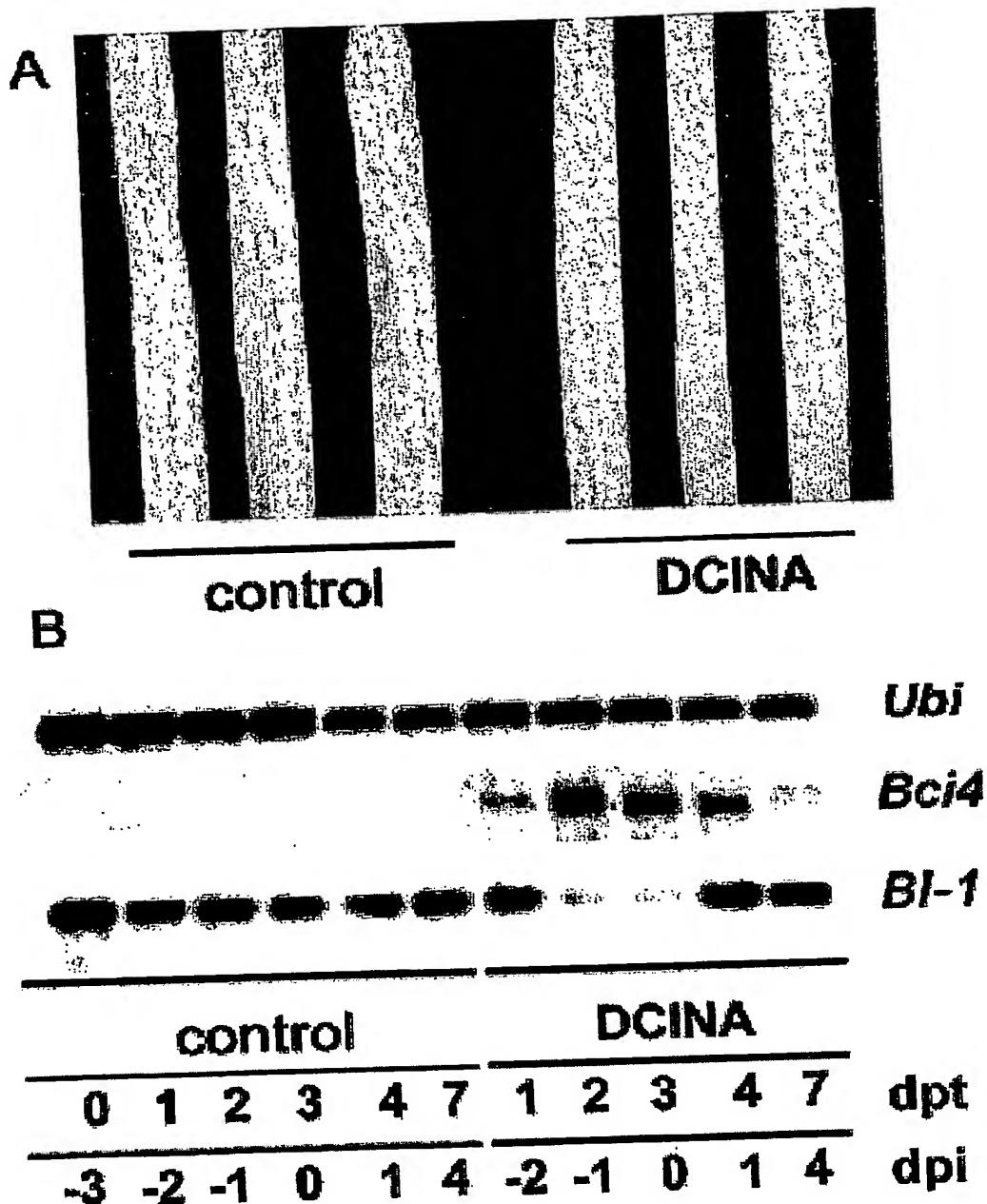


Fig. 9

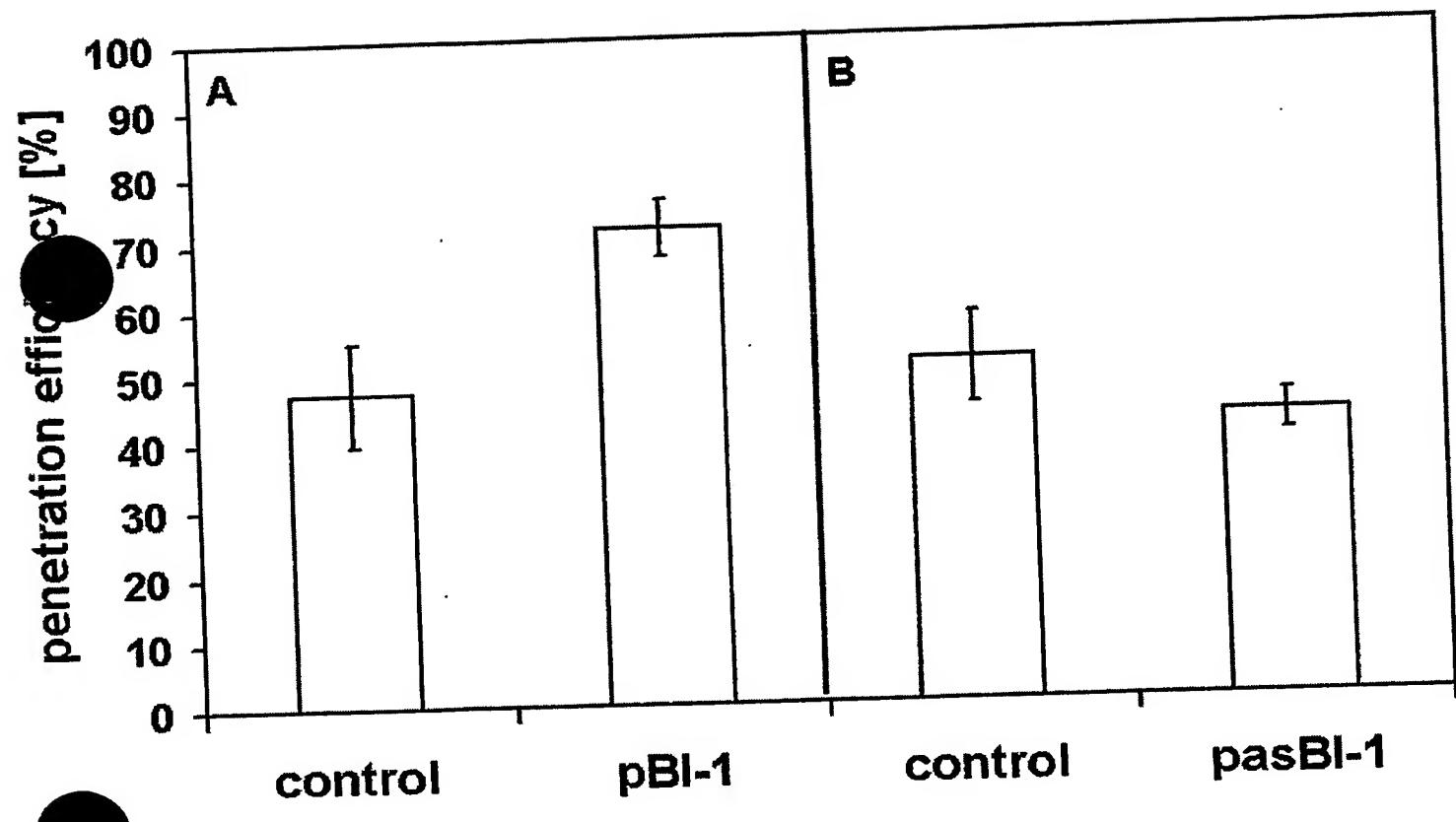
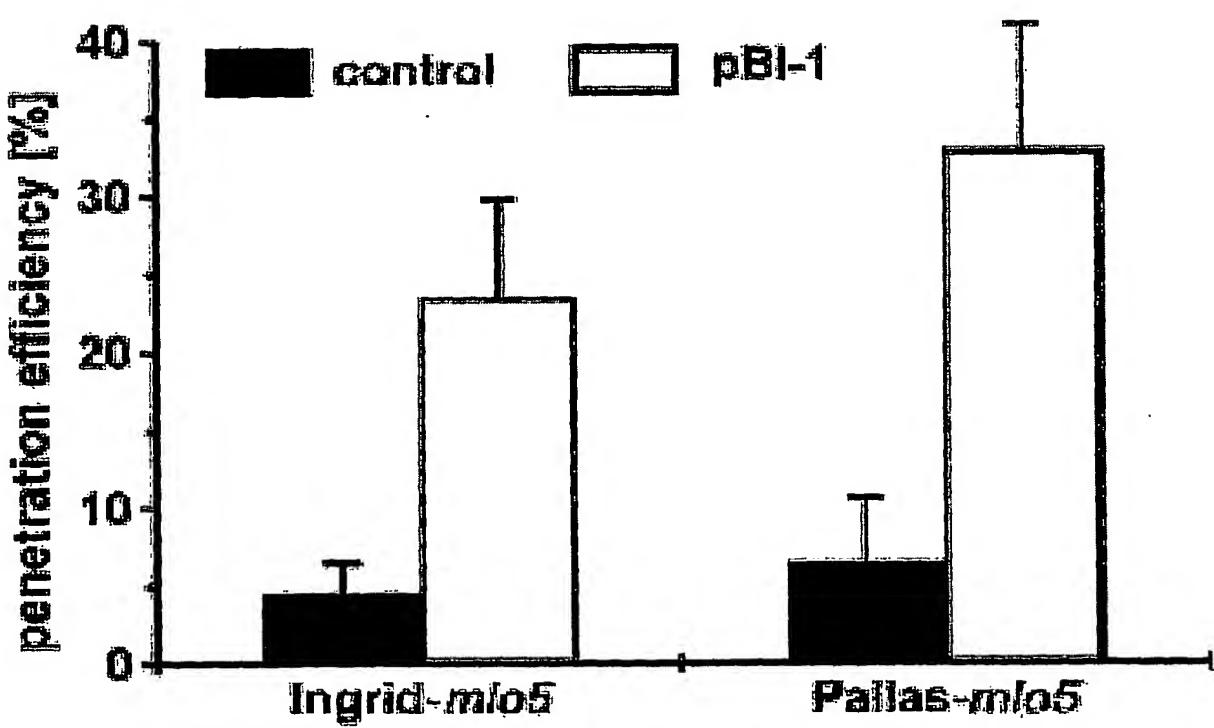


Fig.10



**Fig. 11**

BEST AVAILABLE COPY

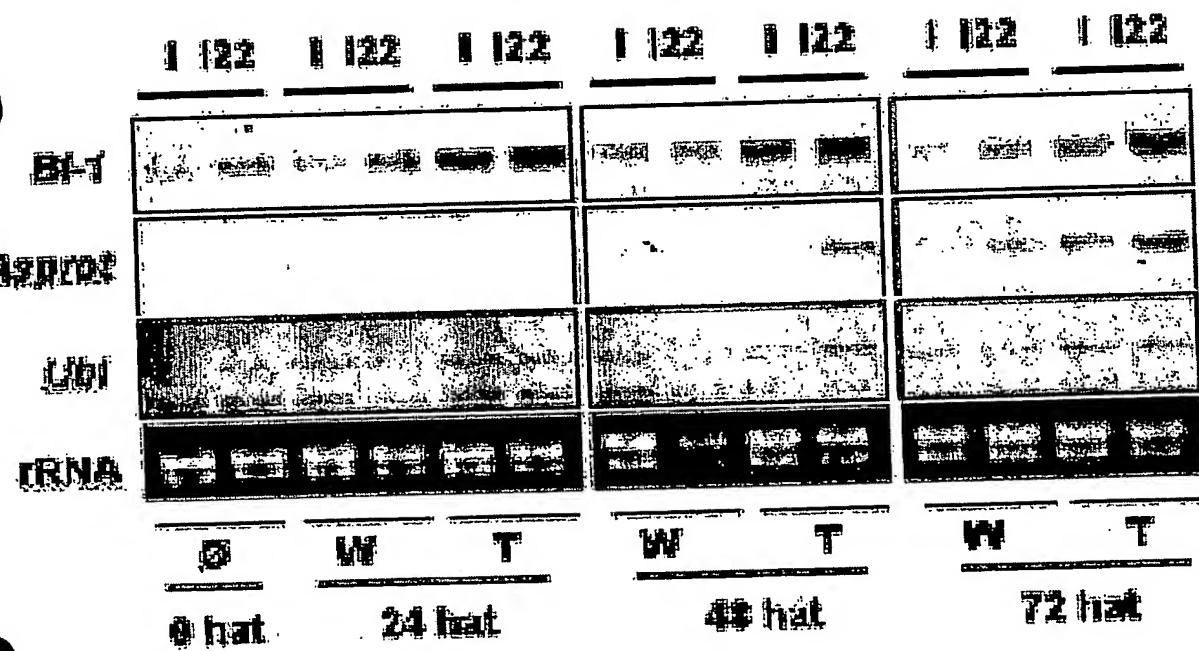
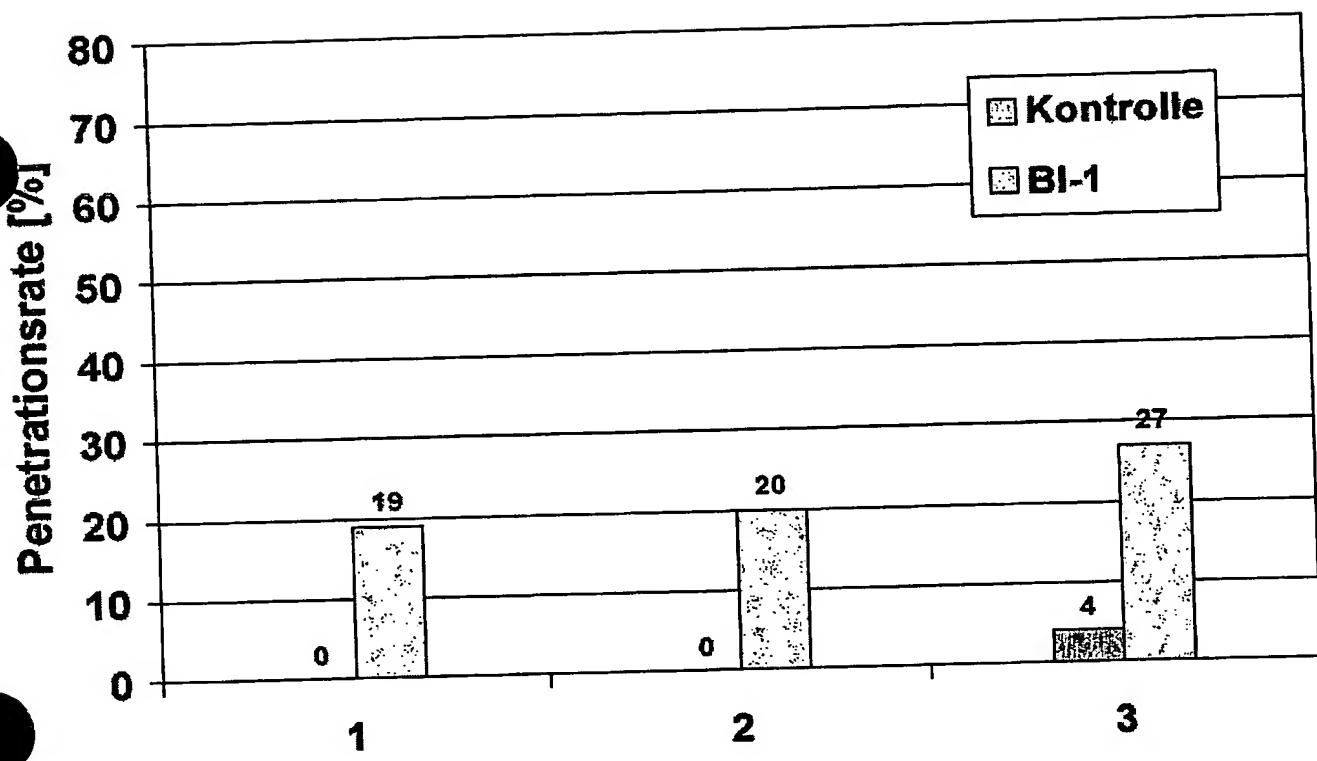


Fig.12



**Fig. 13**

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF Plant Science GmbH

5 <120> Verfahren zur Erhöhung der Resistenz gegen  
Streßfaktoren in Pflanzen

&lt;130&gt; AE20030082

10 <140>  
<141>

&lt;160&gt; 36

15 &lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 744

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Hordeum vulgare

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(741)

25 &lt;223&gt; coding for B11-protein

<400> 1	48
atg gac gcc ttc tac acc tcg tcg gcg gcg agc ggc tgg ggc	
Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ser Gly Trp Gly	
30 1 5 10 15	
cac gac tcc ctc aag aac ttc cgc cag atc tcc ccc gcc gtg cag tcc	96
His Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser	
20 25 30	
35 cac ctc aag ctc gtt tac ctg act cta tgc ttt gca ctg gcc tca tct	144
His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser	
35 40 45	
40 gcc gtc ggt gct tac cta cac att gcc ctg aac atc ggc ggg atg ctg	192
Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu	
50 55 60	
45 aca atg ctc gct tgt gtc gga act atc gcc tgg atg ttc tcg gtg cca	240
Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro	
65 70 75 80	
50 gtc tat gag gag agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc	288
Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu	
85 90 95	
55 ctg gaa ggg gct tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt	336
Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe	
100 105 110	
60 gac cca agc atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc gcc ttt	384
Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe	
115 120 125	
65 ggg tgc ttc tct ggc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg	432
Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu	
130 135 140	
65 tac ctc ggt ggc ctg ctc tcg tct ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg	480
Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu	
145 150 155 160	

[AE-Nr.] REF/... Datum

[ggf. Fig/Seq]

528	cag ttt gtc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt	
	Gln Phe Val Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe	
	165 170 175	
562	gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg ggg tac atg gtg tac gac	
	Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp	
	180 185 190	
624	acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cat ggc gac atg gac tac atc	
	Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile	
	195 200 205	
672	aag cac gcc ctc acc ctc ttc acc gac ttt gtt gcc gtc ctc gtc cga	
	Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg	
	210 215 220	
720	gtc ctc atc atc atg ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag	
	Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys	
	225 230 235 240	
744	aag aag agg aag agg ggg tcc tga	
	Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser	
	245	
5	<210> 2	
	<211> 247	
	<212> PRT	
30	<213> Hordeum vulgare	
	<400> 2	
	Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly	
	1 5 10 15	
35	His Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser	
	20 25 30	
	His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser	
40	35 40 45	
	Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu	
	50 55 60	
45	Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro	
	65 70 75 80	
	Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu	
	85 90 95	
50	Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe	
	100 105 110	
	Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe	
55	115 120 125	
	Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu	
	130 135 140	
60	Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu	
	145 150 155 160	
	Gln Phe Val Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe	
	165 170 175	
65	Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp	

3

	180	185	190
	Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile		
	195	200	205
5	Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg		
	210	215	220
10	Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys		
	225	230	235
	Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser		
	245		
15			
	<210> 3		
	<211> 1067		
	<212> DNA		
20	<213> Arabidopsis thaliana		
	<220>		
	<221> CDS		
	<222> (1)...(741)		
25	<223> coding for BII-protein		
	<400> 3		
	atg gat gcg ttc tct tcc ttc gat tct caa cct ggt agc aga agc		
	Met Asp Ala Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser		
30	1	5	10
			15
	tgg agc tat gat tct ctt aaa aac ttc cgt cag att tct cca gcc gtt		
	Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val		
	20	25	30
35	cag aat cat ctt aaa cgg gtt tat ttg acc tta tgt tgt gct ctt gtg		
	Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val		
	35	40	45
40	gcg tct gcc ttt gga gct tac ctc cat gtg ctc tgg aat atc ggc ggt		
	Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly		
	50	55	60
45	att ctt aca acg att gga tgt att gga act atg att tgg ctc ctt tca		
	Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Ile Gly Thr Met Ile Trp Leu Leu Ser		
	65	70	75
50	tgt cct cct tat gaa cac caa aaa agg ctt tct ctt ctg ttt gtg tct		
	Cys Pro Pro Tyr Glu His Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Val Ser		
	85	90	95
	gct gtt ctt gaa ggt gct tct gtt ggc ccc ttg atc aaa gtg gca att		
	Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Ile		
	100	105	110
55	gat gtt gac cca agc atc ctt atc act gca ttt gtt gga act gcg ata		
	Asp Val Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile		
	115	120	125
60	gcg ttt gtc tgt ttc tca gca gca gca atg tta gca aga cgc agg gag		
	Ala Phe Val Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu		
	130	135	140
65	tat ctc tac ctt gga gga ctg ctt tca tct ggc ttg tct atg cta atg		
	Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met		
	145	150	155
			160



## 5

Ala Phe Val Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu  
130 135 140

5 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met  
145 150 155 160

Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe  
165 170 175

10 Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val  
180 185 190

Val Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp  
195 200 205

15 Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe  
210 215 220

20 Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Glu  
225 230 235 240

Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn  
245

25

<210> 5  
<211> 1160

<212> DNA  
30 <213> Nicotiana tabacum

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(747)

35 <223> coding for BI1-protein

<400> 5

40 atg gag tct tgc aca tcg ttc aat tca cag tcg gcg tcg tct cgc 48  
Met Glu Ser Cys Thr Ser Phe Phe Asn Ser Gln Ser Ala Ser Ser Arg  
1 5 10 15

aat cgc tgg agt tac gat tct ctt aag aac ttc cgc cag atc tct ccc 96  
Asn Arg Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro  
20 25 30

45 ttt gtt caa act cat ctc aaa aag gtc tac ctt tca tta tgt tgt gct 144  
Phe Val Gln Thr His Leu Lys Val Tyr Leu Ser Leu Cys Cys Ala  
35 40 45

50 tta gtt gct tcg gct gct gga gct tac ctt cac att ctt tgg aac att 192  
Leu Val Ala Ser Ala Ala Gly Ala Tyr Leu His Ile Leu Trp Asn Ile  
50 55 60

55 ggt ggc tta ctt acg aca ttg gga tgg gtc gga agc ata gtg tgg ctg 240  
Gly Gly Leu Leu Thr Thr Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Val Trp Leu  
65 70 75 80

60 atg gcg aca cct ctg tat gaa gag caa aag agg ata gca ctt ctg atg 288  
Met Ala Thr Pro Leu Tyr Glu Glu Gln Lys Arg Ile Ala Leu Leu Met  
85 90 95

65 gca gct gca ctg ttt aaa gga gca tct att ggt cca ctg att gaa ttg 336  
Ala Ala Ala Leu Phe Lys Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Glu Leu  
100 105 110

gct att gac ttt gac cca agc att gtg atc ggt gct ttt gtt ggt tgt 384

## 6

Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile Val Ile Gly Ala Phe Val Gly Cys  
 115 120 125

5 gct gtg gct ttt ggt tgc ttc tca gct gct gcc atg gtg gca agg cgc 432  
 Ala Val Ala Phe Gly Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Val Ala Arg Arg  
 130 135 140

10 aga gag tac ttg tat ctt gga ggt ctt ctt tca tct ggt ctc tct atc 480  
 Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile  
 145 150 155 160

15 ctt ttc tgg ttg cac ttc gcg tcc tcc att ttt ggt ggt tct atg gcc 528  
 Leu Phe Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Met Ala  
 165 170 175

20 ttg ttc aag ttc gag gtt tat ttt ggg ctc ttg gtg ttt gtg ggc tat 576  
 Leu Phe Lys Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr  
 180 185 190

25 ttg gac tac gtg aag cat gct ctg acc ctc ttt aca gat ttt gtt gct 672  
 Leu Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala  
 210 215 220

30 gtt ttt gtg cga ata tta atc ata atg ctg aag aat gca tcc gac aag 720  
 Val Phe Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys  
 225 230 235 240

35 gaa gag aag aag aag agg aga aac taatgcataa gcggttattc 767  
 Glu Glu Lys Lys Lys Arg Arg Asn  
 245

40 aaagactctg taactctaga atctggcatt ttcttgcatt taaacttctg tagacccattcg 827  
 acaagttatgt tgtaatagt ttggtaacgc ctcagattaa gctgcgaggc tctgttatgc 887

45 cgcattccaa tgggttatg gtggcacata gatggtttg ttccgaaagc ataccatcaa 947  
 ataacatgca tggttacact atatcgataa cctacgagtg tactacttat ttctgtcccc 1007  
 ttttgctgtg ttaggttattt catgattgtt tagttgattt tccgttatgt tagaccatct 1067  
 tcttcttga cgttaattt ctcatttga tgggagaaat gaaaattcac accgtcgccc 1127  
 caacttgttt aagactgagg cgcaattgtt gtt 1160

50 <210> 6  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Nicotiana tabacum

55 <400> 6  
 Met Glu Ser Cys Thr Ser Phe Phe Asn Ser Gln Ser Ala Ser Ser Arg  
 1 5 10 15

60 Asn Arg Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro  
 20 25 30

Phe Val Gln Thr His Leu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Leu Cys Cys Ala  
 35 40 45

65 Leu Val Ala Ser Ala Ala Gly Ala Tyr Leu His Ile Leu Trp Asn Ile

7

5	ggg atg ttg act atg ctc ggg tgc ggg agc atc gcc tgg ttg ttc Gly Met Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe 65 70 75 80	240
10	tcg gtg cct gtc ttt gag gag agg aag agg ttt ggg att ctc ttg gcc Ser Val Pro Val Phe Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Ile Leu Leu Ala 85 90 95	288
15	gct gcc ctg ctg gaa ggg gct tca gtt ggg cct ctg atc aag ctt gct Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala 100 105 110	336
20	gta gac ttt gac tca agc att ctc gta aca gca ttt gtt gga act gcc Val Asp Phe Asp Ser Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala 115 120 125	384
25	att gca ttt ggg tgc ttc act tgc gct gcc atc gtt gcc aag cgt agg Ile Ala Phe Gly Cys Phe Thr Cys Ala Ala Ile Val Ala Lys Arg Arg 130 135 140	432
30	gag tac ctc tac ctt ggt ggt ttg ctc tct tct ggc ctc tcc atc ctg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu 145 150 155 160	480
35	ctc tgg ctg cag ttt gcc gca tcc atc ttt ggc cac tcc acc ggc agc Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile Phe Gly His Ser Thr Gly Ser 165 170 175	528
40	tac atg ttt gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg ggg tac atg Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met 180 185 190	576
45	gtg tat gac acg cag gag atc atc gag agg gct cac cac ggt gac atg Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met 195 200 205	624
50	gac tac atc aag cac gca ctc acc ctc ttc act gac ttc gtg gcc gtc Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val 210 215 220	672
55	ctt gtc cgg atc ctc gtc atc atg ctc aag aac gcg tct gac aag tcg Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ser 225 230 235 240	720
60	gag gag aag agg aag agg tct tgagagcttc tcttcccgct Glu Glu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser 245	767
65	ttgcacataa gaaaaaacca cggcggtat tgcctctacg tattatgaca gagccgcact tcaactgggt tttatggta atacaagttc ttttgcattt tggtgatacg gtgtgaatct tctcaggttt gtcgtcgtag tagctttgca aatactagca tgctacatga cacggatctt tctgtaatgg tggtcgcgtt gatcgaaacg tgaaaacaca tcttcatttg cgactaattt gtttgcctt tggtgattga tgatgatcct ttccccaaaa aaaaaaaaaa <210> 8 <211> 249 <212> PRT <213> Oryza sativa <400> 8	827 887 947 1007 1056

9

Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Ala Ala Ala Ser  
1 5 10 15

5 Gly Trp Gly Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala  
20 25 30

Val Gln Ser His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Val Ala Leu  
35 40 45

10 Ala Ala Ser Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Ala Leu Asn Ile Gly  
50 55 60

Gly Met Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe  
65 70 75 80

15 Ser Val Pro Val Phe Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Ile Leu Leu Ala  
85 90 95

Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala  
20 100 105 110

Val Asp Phe Asp Ser Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala  
115 120 125

25 Ile Ala Phe Gly Cys Phe Thr Cys Ala Ala Ile Val Ala Lys Arg Arg  
130 135 140

Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu  
145 150 155 160

30 Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile Phe Gly His Ser Thr Gly Ser  
165 170 175

Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met  
35 180 185 190

Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met  
195 200 205

40 Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val  
210 215 220

Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ser  
225 230 235 240

45 Glu Glu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser  
245

50 <210> 9  
<211> 973  
<212> DNA  
<213> Brassica napus

55 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)...(741)  
<223> coding for B11-protein

60 <400> 9  
atg gat tca ttc tcg tcc ttc gat tct caa cct ggt agc aga agc 48  
Met Asp Ser Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser  
1 5 10 15

65 tgg agc tat gat tct ctc aaa aac ctc cgt cag att tct ccc tcc gtc 96

## 10

Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Leu Arg Gln Ile Ser Pro Ser Val	20	25	30	
cag aat cat ctc aag agg gtt tat ctc act ctg tgt tgt gct ctc gtt				144
5 Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val	35	40	45	
gag tct gcg ttt gga gct tac ctc cac gtg ctc tgg aac ata ggt ggt				192
10 Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly	50	55	60	
att ctc act acc att gga tgc ttt gga agc atg att tgg ctg ctc tcc				240
Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Phe Gly Ser Met Ile Trp Leu Leu Ser	65	70	75	
15 tgt cct cct tat gaa caa caa aag agg ctt tcc ctt ctg ttt ctg tct				288
Cys Pro Pro Tyr Glu Gln Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ser	85	90	95	
20 gct gtt ctc gaa ggt gct tca gtt ggt ccc ttg atc aaa gtg gca gtt				336
Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Val	100	105	110	
25 gat ttt gac cca agc atc ctc atc act gcg ttt gtc gga act gcg ata				384
Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile	115	120	125	
30 gcc ttt atc tgt ttc tca ggg gca gcg atg ttg gca aga cgc aga gag				432
Ala Phe Ile Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu	130	135	140	
35 tac ctc tac ctc gga gga ctg ctt tca tct ggc ttg tcc atg ctt atg				480
Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met	145	150	155	
40 tgg ctt cag ttt gcc tct tcc atc ttt ggt ggc tct gca tcc atc ttt				528
Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe	165	170	175	
45 gtg gac act caa gat att ata gag aag gcc cac ctc ggt gac atg gat				576
Val Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp	195	200	205	
50 tac gtc aaa cat tcg ttg acc ctt ttc acc gat ttt gta gct gtg ttt				624
Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe	210	215	220	
55 gtt cgt gtt ctc atc att atg ctg aag aac tcg gca gat aaa gaa gat				672
Val Arg Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Asp	225	230	235	
60 aaa aag aag agg agg aac tgagactaaa aagtgagaaa gaaagctaaa				720
Lys Lys Lys Arg Arg Arg Asn	245			
65 tagagtgggt gttatgtgtg ttcaaaaaaa taaaaaagag tgggtgttat aagtacagac				771
atgatagcgt tgggttttt tactgtttg gaacagtttt ggtaacaaca cacgttacgt				831
atttgtgtat tccttttagt gactccagat tgtgaatgga tcagtatctt gaaactgtgt				891
65 tgaaaattat cagttgggag ct				951
				973

5 <210> 10  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> Brassica napus  
 10 <400> 10  
 Met Asp Ser Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser  
 1 5 10 15  
 Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Leu Arg Gln Ile Ser Pro Ser Val  
 20 25 30  
 15 Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val  
 35 40 45  
 .  
 Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly  
 50 55 60  
 20 Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Phe Gly Ser Met Ile Trp Leu Leu Ser  
 65 70 75 80  
 25 Cys Pro Pro Tyr Glu Gln Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ser  
 85 90 95  
 30 Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Val  
 100 105 110  
 35 Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile  
 115 120 125  
 Ala Phe Ile Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu  
 130 135 140  
 40 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met  
 145 150 155 160  
 Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe  
 165 170 175  
 Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val  
 180 185 190  
 45 Val Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp  
 195 200 205  
 Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe  
 210 215 220  
 50 Val Arg Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Asp  
 225 230 235 240  
 Lys Lys Lys Arg Arg Arg Asn  
 245

60 <210> 11  
<211> 747  
<212> DNA  
<213> Glycine max

65 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(744)

&lt;223&gt; coding for B11-protein

<400> 11	cga ttg caa gca atg gac gcc ttc aat tcc ttc ttc gat tca aga aac	48
5	cga ttg caa gca atg gac gcc ttc aat tcc ttc ttc gat tca aga aac Arg Leu Gln Ala Met Asp Ala Phe Asn Ser Phe Phe Asp Ser Arg Asn 1 5 10 15	
10	cga tgg aat tac gat act ctc aaa aac ttc cgt cag att tct ccg gtc Arg Trp Asn Tyr Asp Thr Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Val 20 25 30	96
15	gtg cag aat cac ctg aag cag gtt tat ttt act ctg tgg ttt gcc gtc Val Gln Asn His Leu Lys Gln Val Tyr Phe Thr Leu Cys Phe Ala Val 35 40 45	144
20	gtt gct gcg gct gtc ggg gct tac ctt cat gtc ctc ttg aac att ggg Val Ala Ala Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Leu Asn Ile Gly 50 55 60	192
25	ggt ttt ctt act aca gtc gca tgc atg gga agc agc ttt tgg tta ctc Gly Phe Leu Thr Thr Val Ala Cys Met Gly Ser Ser Phe Trp Leu Leu 65 70 75 80	240
30	tcc aca cct cct ttt gaa gag agg aag agg gtc act ttg ttg atg gcc Ser Thr Pro Pro Phe Glu Glu Arg Lys Val Thr Leu Leu Met Ala 85 90 95	288
35	gca tca ctg ttt cag ggt tcc tct att gga ccc ttg att gat ttg gct Ala Ser Leu Phe Gln Gly Ser Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala 100 105 110	336
40	att cat atc gat cca agc ctt atc ttt agt gca ttt gtc gga aca gcc Ile His Ile Asp Pro Ser Leu Ile Phe Ser Ala Phe Val Gly Thr Ala 115 120 125	384
45	ttg gcc ttt gca tgc ttc tca gga gca gct ttg gtt gct agg cgt agg Leu Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg 130 135 140	432
50	gag tac ctg tac ctt ggt ggc ttg gtt tct tct gga ttg tcc atc ctt Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Val Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu 145 150 155 160	480
55	ctc tgg ttg cac ttt gct tct tcc atc ttt gga ggc tca aca gct ctc Leu Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Thr Ala Leu 165 170 175	528
60	ttt aag ttt gag ttg tac ttt ggg ctt ttg gtc ttt gta ggt tac att Phe Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Ile 180 185 190	576
65	gta gta gac acc caa gaa ata gtt gag agg gca cac ttg ggc gat ctg Val Val Asp Thr Gln Glu Ile Val Glu Arg Ala His Leu Gly Asp Leu 195 200 205	624
70	gac tat gta aag cat gcc ttg acc ttg ttt acc gat ttg gtc gca gtt Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Val Ala Val 210 215 220	672
75	ttt gtc cgg att ctt gtt att atg ttg aag aat tcg act gag agg aat Phe Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ser Thr Glu Arg Asn 225 230 235	720
80	gag aag aaa aag aag aga aga gat tga Glu Lys Lys Lys Arg Arg Asp 245	747

5           <210> 12  
          <211> 248  
          <212> PRT  
          <213> Glycine max

10           <400> 12  
          Arg Leu Gln Ala Met Asp Ala Phe Asn Ser Phe Phe Asp Ser Arg Asn  
          1                           5                           10                           15

15           Arg Trp Asn Tyr Asp Thr Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Val  
          20                           25                           30

20           Val Gln Asn His Leu Lys Gln Val Tyr Phe Thr Leu Cys Phe Ala Val  
          35                           40                           45

25           Val Ala Ala Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Leu Asn Ile Gly  
          50                           55                           60

30           Gly Phe Leu Thr Thr Val Ala Cys Met Gly Ser Ser Phe Trp Leu Leu  
          65                           70                           75                           80

35           Ser Thr Pro Pro Phe Glu Glu Arg Lys Arg Val Thr Leu Leu Met Ala  
          85                           90                           95

40           Ala Ser Leu Phe Gln Gly Ser Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala  
          100                           105                           110

45           Ile His Ile Asp Pro Ser Leu Ile Phe Ser Ala Phe Val Gly Thr Ala  
          115                           120                           125

50           Leu Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg  
          130                           135                           140

55           Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Val Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu  
          145                           150                           155                           160

60           Leu Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Thr Ala Leu  
          165                           170                           175

65           Phe Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Ile  
          180                           185                           190

70           Val Val Asp Thr Gln Glu Ile Val Glu Arg Ala His Leu Gly Asp Leu  
          195                           200                           205

75           Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Val Ala Val  
          210                           215                           220

80           Phe Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ser Thr Glu Arg Asn  
          225                           230                           235                           240

85           Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asp  
          245

90           <210> 13  
          <211> 1510  
          <212> DNA  
          <213> Glycine max

95           <220>  
          <221> CDS  
          <222> (1)...(777)

&lt;223&gt; coding for BI-1 protein

&lt;400&gt; 13

5	atc acg aaa act ata cga ttc gat tcc ttg ttt tcg atg gac act ttc Ile Thr Lys Thr Ile Arg Phe Asp Ser Leu Phe Ser Met Asp Thr Phe 1 5 10 15	48
10	ttc aag tcc cca tct tct tct tcg aga agc cgc tgg agt tac gat Phe Lys Ser Pro Ser Ser Ser Ser Arg Ser Arg Trp Ser Tyr Asp 20 25 30	96
15	act ctc aag aat ttc cgc gag atc tct ccg ctc gtt cag aat cac atc Thr Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Leu Val Gln Asn His Ile 35 40 45	144
20	aaa ctg gtt tat ttt acg tta tgt tgc gct gtg gtc gct gct gtt Lys Leu Val Tyr Phe Thr Leu Cys Cys Ala Val Val Ala Ala Ala Val 50 55 60	192
25	gga gct ttc ctt cat gtt ctg tgg aac att ggc ggt ttt ctc acc acg Gly Ala Phe Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr 65 70 75 80	240
30	ttg gct tcc att ggg agc atg ttt tgg ttg cta tct aca ccc cct ttt Leu Ala Ser Ile Gly Ser Met Phe Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro Phe 85 90 95	288
35	gaa gag caa aag agg ttg tct ctg ttg atg gct tcg gcc ctg ttt cag Glu Glu Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Met Ala Ser Ala Leu Phe Gln 100 105 110	336
40	ggt gct tcc att gga cct ctg att gat ttg gct ttt gcc att gat cct Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Phe Ala Ile Asp Pro 115 120 125	384
45	ggc ctt atc att ggc gca ttt gtg gca act tct ttg gct ttt gct tgc Gly Leu Ile Ile Gly Ala Phe Val Ala Thr Ser Leu Ala Phe Ala Cys 130 135 140	432
50	ttt tct gca gta gcc tta gtt gca agg cga agg gag tac ctc tac ctt Phe Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu 145 150 155 160	480
55	ggt ggt ttg ctt tct tgg ctt tcc att ctt atg tgg ttg cac tct Gly Gly Leu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Ile Leu Met Trp Leu His Ser 165 170 175	528
60	gat tcc tct ctc ttt ggg ggc tca att gca ctc ttc aag ttt gag ctg Asp Ser Ser Leu Phe Gly Gly Ser Ile Ala Leu Phe Lys Phe Glu Leu 180 185 190	576
65	tac ttt ggg ctt ttg gtg ttt gtg ggc tac gtt ata gta gac act caa Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Val Ile Val Asp Thr Gln 195 200 205	624
70	gaa att att gaa agg gct cac ttt ggt gac ctg gat tat gtg aag cat Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Phe Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His 210 215 220	672
75	gca ttg aca ttg ttc act gat ttg gct gca atc ttt gtg cga att ctt Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Ala Ala Ile Phe Val Arg Ile Leu 225 230 235 240	720
80	att ata atg ttg aag aat tca tct gag aga aat gag aag aag aag aaa Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ser Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys 245 250 255	768

agg aga gat tagtaggctg accgaccgac tcgagcttag gcttctctac 817  
Arg Arg Asp

5 agtaatttag tttgtggaga atacataatt agctgtttag atgatgttgg tcccttgtgt 877  
agttagttag ctatgtgtt gctgtaatgg taaatgtcag gatttcttt aaacatcttc 937  
10 atatgtattt gccaatatca taatgtgtcg tataacatca taccttgggtt taaaaaaaaa 997  
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaann nnnnnnnnnnn 1057  
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnngg tgtttgtggg ctacgttata 1117  
15 gtagacactc aagtaatcat tgagaggct cacttgggt acctggatta tgtaagcat 1177  
gcattgacac tgttcaactga tttggctgca atctttgtgc gaattcttaa tataatgttgc 1237  
20 aataattcat ctaagagaaaa tgagaagaag aggaggagag attaataggt tgaccgattg 1297  
ctatgtgtag agtaatttgg tttgttagaga atacataatt agctgtttag aagttgttgg 1357  
tccccttggtagtttagtag ttagctatgt gtttgcgtta atggtaaatg tcaggatttc 1417  
25 ttttaaacat tttcatatgt atttgctaatt aatcataata tatagtataaa acatcattcc 1477  
ttgggtttaaa aaaagaaaaa aaaaaaaaaaa aaa 1510

30 <210> 14  
<211> 259  
<212> PRT  
<213> Glycine max

35 <400> 14  
Ile Thr Lys Thr Ile Arg Phe Asp Ser Leu Phe Ser Met Asp Thr Phe  
1 5 10 15

40 Phe Lys Ser Pro Ser Ser Ser Ser Arg Ser Arg Trp Ser Tyr Asp  
20 25 30  
Thr Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Leu Val Gln Asn His Ile  
35 40 45

45 Lys Leu Val Tyr Phe Thr Leu Cys Cys Ala Val Val Ala Ala Ala Val  
50 55 60

50 Gly Ala Phe Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr  
65 70 75 80

Leu Ala Ser Ile Gly Ser Met Phe Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro Phe  
85 90 95

55 Glu Glu Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Met Ala Ser Ala Leu Phe Gln  
100 105 110

Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Phe Ala Ile Asp Pro  
115 120 125

60 Gly Leu Ile Ile Gly Ala Phe Val Ala Thr Ser Leu Ala Phe Ala Cys  
130 135 140

Phe Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu  
145 150 155 160

65 Gly Gly Leu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Ile Leu Met Trp Leu His Ser

## 16

165

170

175

Asp Ser Ser Leu Phe Gly Gly Ser Ile Ala Leu Phe Lys Phe Glu Leu  
 180 185 190

5 Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Val Ile Val Asp Thr Gln  
 195 200 205

10 Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Phe Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His  
 210 215 220

Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Ala Ala Ile Phe Val Arg Ile Leu  
 225 230 235 240

15 Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ser Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys  
 245 250 255

Arg Arg Asp

20

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 651

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum aestivum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

30 &lt;222&gt; (1)...(651)

&lt;223&gt; coding for BI-1 protein

&lt;400&gt; 15

gtc gca atg ccg ggt cga cga ttt cgt ctg acc tat gct ttg cct ggc  
 35 Val Ala Met Pro Gly Arg Arg Phe Arg Leu Thr Tyr Ala Leu Pro Gly  
 1 5 10 15

ctc atc tgc cgt ggg tgc tta cct gca cat tgc cct gaa cat tgg cgg  
 Leu Ile Cys Arg Gly Cys Leu Pro Ala His Cys Pro Glu His Trp Arg  
 20 25 30

40 gat gct gac aat gct cgc gtg tat cgg aac cat cgc ctg gat gtt ctc  
 Asp Ala Asp Asn Ala Arg Val Tyr Arg Asn His Arg Leu Asp Val Leu  
 35 40 45

45 ggt gcc agt cta cga gga gag gaa gag gtt tgg gct gct gat ggg tgc  
 Gly Ala Ser Leu Arg Gly Glu Glu Val Trp Ala Ala Asp Gly Cys  
 50 55 60

50 agc ctc ctg gaa ggg gct tca gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata  
 Ser Leu Leu Glu Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile  
 65 70 75 80

55 gac ttt gac cca agt atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc  
 Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile  
 85 90 95

60 gcc ttc ggg tgc ttc tct ggc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag  
 Ala Phe Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu  
 100 105 110

65 tac ctg tac ctc ggt ggt ctg ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc  
 Tyr Leu Tyr Leu Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu  
 115 120 125

tgg ctg cag ttt gcc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc 432

17

Trp	Leu	Gln	Phe	Ala	Thr	Ser	Ile	Phe	Gly	His	Ser	Ser	Gly	Ser	Phe				
130						135					140								
5	atg	ttt	gag	gtt	tac	ttt	ggc	ctg	ttg	atc	ttc	ctg	gga	tac	atg	gtg	480		
	Met	Phe	Glu	Val	Tyr	Phe	Gly	Leu	Leu	Ile	Phe	Leu	Gly	Tyr	Met	Val			
	145					150					155				160				
10	tac	gac	acg	cag	gag	atc	atc	gag	agg	gcg	cac	cac	ggc	gac	atg	gat	528		
	Tyr	Asp	Thr	Gln	Glu	Ile	Ile	Glu	Arg	Ala	His	His	Gly	Asp	Met	Asp			
						165				170				175					
15	tac	atc	aag	cac	gcg	ctc	acc	ctc	ttc	acc	gac	ttc	gtc	gcc	gtt	ctc	576		
	Tyr	Ile	Lys	His	Ala	Leu	Thr	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Val	Ala	Val	Leu			
						180			185				190						
20	gtc	cgc	gtc	ctc	atc	atc	ttg	ctc	aag	aac	gca	gcg	gac	aag	gtc	gga	624		
	Val	Arg	Val	Leu	Ile	Ile	Leu	Leu	Lys	Asn	Ala	Ala	Asp	Lys	Val	Gly			
						195			200				205						
25	<210>	16	<211>	217	<212>	PRT	<213>	Triticum aestivum											
30	<400>	16	Val	Ala	Met	Pro	Gly	Arg	Arg	Phe	Arg	Leu	Thr	Tyr	Ala	Leu	Pro	Gly	
			1				5					10					15		
35	Leu	Ile	Cys	Arg	Gly	Cys	Leu	Pro	Ala	His	Cys	Pro	Glu	His	Trp	Arg			
			20				25					30							
40	Asp	Ala	Asp	Asn	Ala	Arg	Val	Tyr	Arg	Asn	His	Arg	Leu	Asp	Val	Leu			
			35				40					45							
45	Gly	Ala	Ser	Leu	Arg	Gly	Glu	Glu	Glu	Val	Trp	Ala	Ala	Asp	Gly	Cys			
			50				55					60							
50	Ser	Leu	Leu	Glu	Gly	Ala	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ile	Glu	Leu	Ala	Ile			
			65				70					75			80				
55	Asp	Phe	Asp	Pro	Ser	Ile	Leu	Val	Thr	Gly	Phe	Val	Gly	Thr	Ala	Ile			
			85				90					95							
60	Ala	Phe	Gly	Cys	Phe	Ser	Gly	Ala	Ala	Ile	Ile	Ala	Lys	Arg	Arg	Glu			
			100				105					110							
65	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	Leu	Leu			
			115				120					125							
70	Trp	Leu	Gln	Phe	Ala	Thr	Ser	Ile	Phe	Gly	His	Ser	Ser	Gly	Ser	Phe			
			130				135					140							
75	Met	Phe	Glu	Val	Tyr	Phe	Gly	Leu	Leu	Ile	Phe	Leu	Gly	Tyr	Met	Val			
			145				150					155			160				
80	Tyr	Asp	Thr	Gln	Glu	Ile	Ile	Glu	Arg	Ala	His	His	Gly	Asp	Met	Asp			
			165				170					175							
85	Tyr	Ile	Lys	His	Ala	Leu	Thr	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Val	Ala	Val	Leu			
			180				185					190							

## 18

Val Arg Val Leu Ile Ile Leu Leu Lys Asn Ala Ala Asp Lys Val Gly  
 195 200 205

5 Gly Gln Glu Glu Glu Glu Lys Ser  
 210 215

10 <210> 17  
 <211> 412  
 <212> DNA  
 <213> Zea mays

15 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (3)...(410)  
 <223> coding for BII-protein

20 <400> 17  
 tt gtt att gac ttg gat tcg agg att ctc gtc act gcg ttc gtc ggg 47  
 Val Ile Asp Leu Asp Ser Arg Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly  
 1 5 10 15

25 acc gca gtt gct ttt gca tgc ttc tct ggc gct gcc atc atc gcc aag 95  
 Thr Ala Val Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys  
 20 25 30

30 cgc agg gaa tac ctg tac ctc ggc ggt ctg ctt tca tct ggc ctc tcc 143  
 Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser  
 35 40 45

35 att ctt ctc tgg ctg cag ttt gct act tca atc ttt ggc cac acc agc 191  
 Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Thr Ser  
 50 55 60

40 gcg acc ttc atg ttt gag ctc tac ttt ggc ctc ctg gtt ttc ctg gga 239  
 Ala Thr Phe Met Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Leu Gly  
 65 70 75

45 gac atg gac tac atc aag cac gcg ctg act ctc ttc acc gac ttt gtt 335  
 Tyr Met Val Phe Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Arg Gly  
 80 85 90 95

50 gcg gtt ctt gtt cga atc ctt gtc atc atg atg aag aat gca cag gag 383  
 Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Met Lys Asn Ala Gln Glu  
 115 120 125

55 aaa tcc caa gac gag aag aag agg aag aa 412  
 Lys Ser Gln Asp Glu Lys Lys Arg Lys  
 130 135

60 <210> 18  
 <211> 136  
 <212> PRT  
 <213> Zea mays

65 <400> 18  
 Val Ile Asp Leu Asp Ser Arg Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Ala Val Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg

19

	20	25	30	
	Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly	Leu Leu Ser Ser Gly	Leu Ser Ile	
	35	40	45	
5	Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly	His Thr Ser Ala		
	50	55	60	
10	Thr Phe Met Phe Glu Leu Tyr Phe Gly	Leu Leu Val Phe Leu Gly	Tyr	
	65	70	75	80
	Met Val Phe Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Arg Gly Asp			
	85	90	95	
15	Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala			
	100	105	110	
	Val Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Met Lys Asn Ala Gln Glu Lys			
20	115	120	125	
	Ser Gln Asp Glu Lys Lys Arg Lys			
	130	135		
25	<210> 19			
	<211> 345			
	<212> DNA			
	<213> Triticum aestivum			
30	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (1)...(342)			
35	<400> 19			
	gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg tac ctc ggt ggc ctg			
	Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu			
	1	5	10	15
40	ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg cag ttt gcc acg tcc			
	Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser			
	20	25	30	
45	atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt gag gtt tac ttt ggc			
	Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly			
	35	40	45	
50	ctg ttg atc ttt ctg gga tac atg gtg tac gac acg cag gag atc atc			
	Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile			
	50	55	60	
	gag agg gcg cac cac ggc gac atg gac tac atc aag cac gcg ctc acc			
	Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr			
	65	70	75	80
55	ctc ttc acc gac ttt gtc gcc gtc ctc gtc cgg atc ctc atc atc atg			
	Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Ile Ile Met			
	85	90	95	
60	ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag aag aag agg aag agg			
	Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys Lys Arg Lys Arg			
	100	105	110	
65	agg tcc tga		345	
	Arg Ser			

5 <210> 20  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Triticum aestivum

10 <400> 20  
 Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser  
 20 25 30  
 Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly  
 15 35 40 45  
 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile  
 50 55 60  
 20 Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Ile Ile Met  
 85 90 95  
 25 Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Arg Lys Arg  
 100 105 110  
 30 Arg Ser

35 <210> 21  
 <211> 403  
 <212> DNA  
 <213> Zea mays

40 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(402)  
 <223> coding for B11-protein

45 <400> 21  
 ggc agc atc gcc tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag  
 1 5 10 15 48  
 Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys  
 50 20  
 agg tac tgg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggg gcg tcg gtt  
 Arg Tyr Trp Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val  
 25 30 96  
 gga ccc ctc atc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg  
 35 40 45 144  
 Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val

55 aca gcg ttc gtg ggg act gcc att gcg ttc gcg tgc ttc tct tgc gcg  
 Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Cys Ala  
 50 55 60 192

60 gcc atg gtg gcc aag cgc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggg ctg ctc  
 Ala Met Val Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu  
 65 70 75 80 240

65 tct tct ggc ctc tcc atc ctg ctc tgg ctg cag ttc gcc gcc tcc atc  
 Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile  
 288

21

85

90

95

ttc ggc cac caa tcc act agc agc ttc atg ttt gag gtc tac ttt ggg  
 Phe Gly His Gln Ser Thr Ser Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly  
 5 100 105 110

336

ctg ctc atc ttc ctg ggc tac atg gtg tac gac acg cag gag gtc atc  
 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Val Ile  
 115 120 125

384

10 gag agg ggc cac cac ggc g  
 Glu Arg Ala His His Gly  
 130

403

15 <210> 22  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 <213> Zea mays

20 <400> 22  
 Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys  
 1 5 10 15

25 Arg Tyr Trp Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val  
 20 25 30  
 Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val  
 35 40 45

30 Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Cys Ala  
 50 55 60  
 Ala Met Val Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu  
 35 65 70 75 80  
 Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile  
 85 90 95

40 Phe Gly His Gln Ser Thr Ser Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly  
 100 105 110  
 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Val Ile  
 115 120 125

45 Glu Arg Ala His His Gly  
 130

50 <210> 23  
 <211> 410  
 <212> DNA  
 <213> Zea mays

55 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (3)..(410)  
 <223> coding for B11-protein

60 <400> 23  
 gc tgg aac atc ggc gtg agg ctg aca atg ctc ggt tgc atc ggc agc  
 Trp Asn Ile Gly Val Arg Leu Thr Met Leu Gly Cys Ile Gly Ser  
 1 5 10 15

47

65 atc gac tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag aag agg tat  
 95

## 22

Ile Asp Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr  
 20 25 30

5 ggg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggc gct tcg gtc gga ccc 143  
 Gly Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro  
 35 40 45

10 ctc gtc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg acg gcg 191  
 Leu Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala  
 50 55 60

15 ttc gtg ggg act gcc atc gcg ttc gcg tgc ttc tcc ggc gcg gcc atg 239  
 Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met  
 65 70 75

20 gtg gcc agg cgc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggg ctg ctc tcg tcg 287  
 Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser  
 80 85 90 95

25 ggg ctc tcc atc ctg ctc tgg ctg cag ctc gcc gcc tcc atc ttc ggc 335  
 Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ala Ala Ser Ile Phe Gly  
 100 105 110

30 cac tcc gca acc agc ttc atg ttc gag gtc tac ttc ggg ctg ctc atc 383  
 His Ser Ala Thr Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile  
 115 120 125

410

ttc ctg ggc tac gtg gtg tac gac acg  
 Phe Leu Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr  
 130 135

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 136

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Zea mays

35 <400> 24  
 Trp Asn Ile Gly Val Arg Leu Thr Met Leu Gly Cys Ile Gly Ser Ile  
 40 1 5 10 15

Asp Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr Gly  
 20 25 30

45 Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu  
 35 40 45

50 Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe  
 50 55 60

55 Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Val  
 65 70 75 80

Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly  
 85 90 95

55 Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ala Ala Ser Ile Phe Gly His  
 100 105 110

60 Ser Ala Thr Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe  
 115 120 125

Leu Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr  
 130 135

65

5 <210> 25  
 <211> 463  
 <212> DNA  
 <213> *Triticum aestivum*  
 10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(462)  
 <223> coding for B11-protein  
 15 <400> 25  
 ttc tca ggt acg ttc cgc aat tcc cgg agc gac gat ttc gtg ctc tgc 48  
 Phe Ser Gly Thr Phe Arg Asn Ser Arg Ser Asp Asp Phe Val Leu Cys  
 1 5 10 15  
 20 gaa ctt cag cga gag ctc ccc cga tgc cgg gac gca acc ttg acg gtc 96  
 Glu Leu Gln Arg Glu Leu Pro Arg Cys Arg Asp Ala Thr Leu Thr Val  
 20 25 30  
 25 gta tac gtg atc cca ata gtg ggc cga ata aaa tct gcc gcg ggt gct 144  
 Val Tyr Val Ile Pro Ile Val Gly Arg Ile Lys Ser Ala Ala Gly Ala  
 35 40 45  
 30 tac ctg cac att gcc ctg aac atc ggt ggg atg ctg aca atg ctt gcg 192  
 Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu Thr Met Leu Ala  
 50 55 60  
 35 tgt atc gga acc att gcc tgg atg ttc tct gtg cca gtc tat gag gag 240  
 Cys Ile Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu  
 65 70 75 80  
 40 agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc ctg gaa ggg gct 288  
 Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala  
 85 90 95  
 45 tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt gac cca agc atc 336  
 Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile  
 100 105 110  
 50 ctc gtg aca ggg ttt gtt gga acc gcc atc gcc ttt ggg tgc ttc tct 384  
 Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Gly Cys Phe Ser  
 115 120 125  
 55 ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg tac ctc gga ggc 432  
 Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly  
 130 135 140  
 60 ctg ctc tcc tcc ggc ctg acg atc ctg ctc t 463  
 Leu Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ile Leu Leu  
 145 150  
 65 <210> 26  
 <211> 154  
 <212> PRT  
 <213> *Triticum aestivum*  
 <400> 26  
 Phe Ser Gly Thr Phe Arg Asn Ser Arg Ser Asp Asp Phe Val Leu Cys  
 1 5 10 15  
 Glu Leu Gln Arg Glu Leu Pro Arg Cys Arg Asp Ala Thr Leu Thr Val  
 20 25 30  
 Val Tyr Val Ile Pro Ile Val Gly Arg Ile Lys Ser Ala Ala Gly Ala

24

35

40

45

Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu Thr Met Leu Ala  
 50 55 60

5 Cys Ile Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu  
 65 70 75 80

10 Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala  
 85 90 95

Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile  
 100 105 110

15 Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Gly Cys Phe Ser  
 115 120 125

Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly  
 130 135 140

20 Leu Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ile Leu Leu  
 145 150

25

<210> 27  
 <211> 388  
 <212> DNA  
 <213> Zea mays

30

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (3)..(386)  
 <223> coding for BII-protein

35

<400> 27 47  
 tc tgg aac atc ggc ggg acg ctg aca atg ctc ggt tgc gtc ggc agc  
 Trp Asn Ile Gly Gly Thr Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser  
 1 5 10 15

40

atc gcc tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag agg tat 95  
 Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr  
 20 25 30

45

ggg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggc gct tcg gtc gga ccc 143  
 Gly Leu Leu Met Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro  
 35 40 45

50

ctc gtc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg acg gcg 191  
 Leu Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala  
 50 55 60

55

ttc gtg ggg act gcc atc gcg ttc gcg tgc ttc tcc ggc ggc cca tgg 239  
 Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Pro Trp  
 65 70 75

60

tgg cag gcc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggc tgc tct cgt cga ggc 287  
 Trp Gln Ala Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Cys Ser Arg Arg Gly  
 80 85 90 95

65

tct cca tcc tgc tct ggc tgc agc tcg ccg cct cca tct tcg gca ctc 335  
 Ser Pro Ser Cys Ser Gly Cys Ser Pro Pro Pro Ser Ser Ala Leu  
 100 105 110

65

cgc aac agc ttc atg ttc gag gtc tac ttc ggg ctg ctc att ctt ctg 383  
 Arg Asn Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Leu Leu

25

115

120

125

388

ggc ta  
Gly

5

<210> 28  
<211> 128

&lt;212&gt; PRT

10 &lt;213&gt; Zea mays

&lt;400&gt; 28

Trp Asn Ile Gly Gly Thr Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile  
1 5 10 15

15

Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr Gly  
20 25 30

20

Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu  
35 40 45Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe  
50 55 60

25

Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Pro Trp Trp  
65 70 75 80Gln Ala Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Cys Ser Arg Arg Gly Ser  
85 90 95

30

Pro Ser Cys Ser Gly Cys Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Ala Leu Arg  
100 105 110

35

Asn Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Leu Leu Gly  
115 120 125

40

<210> 29  
<211> 1737  
<212> DNA  
<213> Solanum tuberosum

45

<220>  
<221> promoter  
<222> (1)...(1737)  
<223> patatin promotor

50

<400> 29  
aagcttatgt tgccatataag agtagttgt gatggtatac ttcataaaact ttaactttagt 60  
ttaaatttgt aatgataaaaa tttttattgt aaattaaaaaa ttacttataa aattgggcat 120  
tataacatata gaaagacaaa ttgttaca tattttactt ttgactttaa tatgaatatt 180  
tcaatttaaa tcattgtttt attttctctt tcttttaca ggtataaaag gtgaaaattg 240  
aagcaagatt gattgcaagc tatgtgtcac cacgttattt atactttgga agaaaatttt 300  
acttatatgt ctttgttag gagtaatatt tgatatgttt tagtttagatt ttcttgcatt 360  
ttatgcattt gtataatttt agttattttt attatatgtt catgggtgaa ttttgataca 420  
aatatttttg tcattaaata aattaattta tcacaacttg attactttca gtgacaaaaaa 480  
atgtattgtc gtagtaccct ttttgttga atatgaataa ttttttttat tttgtgacaa 540  
ttgttaattgt cactacttat gataatattt agtgacatat atgtcgctgg taaaagcaaa 600  
cacttcagt gacaaaaataa tagatttaat cacaataat ttaacctttt ttataataat 660  
aaattttatcc ctaattttata catttaagga caaagtattt tttttatata taaaaaatag 720  
tcttttagtga cgatcgttagt gttgagtctt gaaatcataa ttttgcattt agaaaaatct 780  
catgcagtgt aaaataaaacc tcaaaaaagga cgttcagtcc atagaggggg tttatgtgac 840  
acccaacact cagaaaaaga aacacccct tcaacaagga catttgcggg gctaaaacaat 900  
ttcaagtctc atcacacata tattttattat ataataactaa taaaagaatag aaaaggaaag 960  
gttaaacatca tttaatcgtc tttgtatatt ttttagtgcata actgattgac gaaatctttt 1020

tcgtcacaca aaatttttag tgacgaaaca tgattttag atgatgaaat tatttgc 1080  
 tcataatcta atttgttgc gtgatcatta ctccttgc ttgttttattt gtcatgttag 1140  
 tccattaaaa aaaaatatct ctcttcttgc gtacgtaat gggtggaaacg gatcttattt 1200  
 ataatactaa taaagaatag aaaaaggaaa gtgagtggg ttcgagggg agaatctgtt 1260  
 5 taatatcaga gtcgatcatg tgtcaattt atcgatatgc ccctaacttc aactgagtt 1320  
 aaccaattcc gataaggcga gaaatatacat agtattgagt cttagaaaaat ctcatgttagt 1380  
 gtggggtaaa cctcagcaag gacgttgc ccatacgagg ggggtgtatgt gacaccccaa 1440  
 cctcagcaaa agaaaaatctt ccctcaagaa ggacatttgc ggtgctaaac aatttcaagt 1500  
 ctcatcacac atatataat attatataat actaataaaat aatagaaaaaa gaaaaggtaa 1560  
 10 acatactaa cgacagttgc ggtgcaact gaggaggttataaaacatca ctaactttt 1620  
 ttgggtatgt caaactcaaa gtaaaatttc tcaacttgc tacgtgccta tatataccat 1680  
 gcttgcata tgctcaaagc accaacaacaa tttaaaaaca ctttgaacat ttgcaaa 1737

15 <210> 30  
 <211> 1317  
 <212> DNA  
 <213> Triticum aestivum

20 <220>  
 <221> promoter  
 <222> (1)..(1317)  
 <223> germin 9f-3.8 gene promotor

25 <400> 30  
 gaattcaagc tatcactctc gaaccaagca cattgatgtt aggtatcatt ggattccaga 60  
 tgcgtgagt tccaagttgc tgaaacttgc gaagatccat accgacgaca atggttcaga 120  
 tatgtgacc aagatattgc gaaataagaa gctacaagca tggtcaagg tagcggcat 180  
 30 ggcgttgc ccatcatgag tcggaggggg agatttgc ttgtatccct ctcatgtggg 240  
 ttctgaggag atgaccattt gaggcctttt agccagccca aagagggtca gaagccact 300  
 acccattagg gttatgaccc agggcattt tggactttgc acatgagtgg atgggatgc 360  
 tttaccctcc atccagcgc caccaccaag ggtgacgaaa atcgttcat cctccaagag 420  
 agaagaagag agaaaaaccaa gagacaagg gaagaagagg aagattgaag gaagaagaaa 480  
 35 agggagctcc tcccccaaggt tgcgtatggc catatccact atcttgc ttcacttgc 540  
 cggttccacc atcttgc tgcgtatggc agattttctt aatccctat tcttgc ttcacttgc 600  
 tgcgttcatc caagatttcg aatcttgc tgcgtatggc ttttttttttcc acgtaaaatc 660  
 gaattttttttttcc tcaagttgc ggggttttcc ttttttttttcc acgtaaaatc tgggtctct 720  
 40 ttgtgttgc ccagaaactt actccatca caagacacta gggccagtt ttgggtggc ttggcccat 780  
 attctccag aattgaccct tcccccaagct tctcccagaa ttgtcactcc atttttttttt 900  
 acaattctca gtagttaag gtcttaattt ttaggaattt taaaaaaaata tcaagtggca 960  
 attctggag aagctgggg aaaaaatccat tcttgc ttttttttttcc acattttcttgc 1020  
 taggctgagg agtgcgttgc ctgcgttgc ttttttttttcc acattttcttgc ttttttttttcc 1080  
 tatgtttccct tccgtctaa gcaacgttcc ttgatgttgc acatgatgttgc 1140  
 45 tactttgttt tgcgtcgttgc ttttttttttcc acatgatgttgc ttgatgttgc ttttttttttcc 1200  
 caatatgcca cccgcaactc atccaccata gctcagcagc aaccaccaat gccatagaca 1260  
 ctctcgtaa acaacctgtt gcttatcgtt ttttttttttcc acatgatgttgc ttttttttttcc 1317

50 <210> 31  
 <211> 959  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana

55 <220>  
 <221> promoter  
 <222> (1)..(959)  
 <223> CAB-2 promotor

60 <400> 31  
 gaattcatgt gtgagggcaa ttgtgtttt taaaaataaa attgtgtttt gtaaaaaact 60  
 tttactgtcg aaatttattt ggggtgttagaa aaaatcgttca aactacgttca gatagcttca 120  
 agagtttcttca tcaaaatgttgc tgaggatgttgc ttgtgttttca ttttttttttca ttttttttttcc 180  
 65 ttgtgttttca ttttttttttca ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc 240  
 gaatgatgttca ttttagattt taaaaggatgttca ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc 300  
 atgattaaaaa atttacaagc tacatattgt ctttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc 360

5	atagttttc agtgtttgaa caatcaattt gatagttttt atgtttctgc aaaatatgca	420
	aataatcagt gttttgagt cttgcattt tgatttaaaa gcaaaaacaa ctgagttca	480
	aggtaaattt aattacat ttcatgagat ttatcagggt agtggataaa ctgacaatgg	540
	aatcaatgtt attgttaattt ggtagtgtat ttggacttct aatgttactc tctatgatgt	600
10	ttcggtcatc ggtatcacac tatctttact ttattttaaa gaaaaagatca cacaataag	660
	ttatctctat tcagaactat taagctgctt ccaaaagact tgcaacatgt ggtctcgaaa	720
	tgcttggct gcaatgaaaa aatcatagca aaagctagt gactagagac tgccacataa	780
	gaatagtaaa cgttaaaacc aaaatctcaa aaatccaatg agtaaagaga tatagattac	840
	ttcatagata acaaacgta ctcgaattt tcctatataa tccaaacccta cctaaccatt	900
	ttcaatact ctcactcaca agttagtac caaaaaaaaaaaa aaaaacacaa aaagttca	959
15	<210> 32	
	<211> 445	
	<212> DNA	
	<213> Zea mays	
20	<220>	
	<221> promoter	
	<222> (1)..(445)	
	<223> PPCZml promoter	
25	<400> 32	
	gaattccaaa aatagacacg gcaattttct tattcacaga aaaaatataa ctacaactaa	60
	tccccaagtc cacaggattt agggatcaat ctgcaaaact aaaagtactt ttacagttgt	120
	acttggcatg agtcatgtga ccatgagaga ggcgcacgggt ttagcaaaagc aacataaaat	180
	tctccaaacg ggccccggca cacacgatca ccatcaccctt cgggctcccg acccagtaca	240
	aatagacacg cacactccca actccccacc catctccgccc ggcacacccg cccaaatcagc	300
30	caatcttcctc ctcccttcctc gctctcagac gagcagcggt tgccatcact ctccacttcc	360
	cacggccgct gccccgtcg aggccggaga gaattgtctg tgccggccggg tgggaatttg	420
	attcggtcg attccgtcgcc ccgc	445
35	<210> 33	
	<211> 5455	
	<212> DNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
40	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant expression vector pÜbiBI-1	
45	<400> 33	
	ggggatccctc tagagtcgac ctgcaggcgg ccgcactagt gattaggatt ccaacgcgag	60
	ccagggacaag cgaggaacct tgcgtgcgag gcgaggccgc cccgctccga ttcatgtca	120
	cgcgcaggcg caggcgccagg gatggacgccc ttctactcgat cctcgctggc ggcggcgagc	180
	ggctggggcc acgactccctt caagaacttc cgcgcacatctt ccccgccgt gcagtcccac	240
	ctcaagctcg ttacactcgat tctatgtttt gcaactggccat cattcgccat ggggtgttac	300
	ctacacatttgc ccttgcacat cggcgggatg ctgacaatgc tgcgttgcgtt cgaaactatc	360
50	gcctggatgt ttcgggtgcc agtctatgag gagaggaaga gttttgggt gctgtatgggt	420
	gcaggccctcc tggaaaggggc ttccgttggc cctctgattt agcttgcattt agactttgac	480
	ccaagcatcc tcgtgacagg gtttgcggc accgcattcg ctttgggtt cttctctggc	540
	gccgcattca tcgccaagcg caggagttac ctgtacactcg gtggcctgtt ctcgtctggc	600
	ctgtcgatcc tgctctggct gcagttgtt acgtccatctt tggccactc ctctggcagc	660
55	ttcatgtttt aggtttactt tggctgtt atcttcttgg ggtacatgtt gtacgacacg	720
	caggagatca tcgaggaggc gcacattggc gacatggact acatcaagca cgccttcacc	780
	ctcttcacccg actttgttgc cgtctctgc ctagtccatca tcatctgtt caagaacgc	840
	ggcgacaatgtt cggaggacaa gaagaagagg aagagggggtt cttgttgcgtw tctccgcac	900
60	atgttagatac cgttccatcg tggccatcg ggcattttttt ctgaaatcac cagttctct	960
	ctacaaatctt atctcttcata taataatgtt tgtagtagttt ccagataagg gaatttaggt	1020
	tcttataggg ttccgttcat gtgttgcgc tataagaaac ctttagtattt tattttgtatt	1080
	tgtaaaatac ttctatcaat aaaatttcttta attccctaaaa caaaaatcca gtgggtaccg	1140
	agctcgatattt caagcttggc actggccgtt gttttacaac gtcgtgactg gaaaaaccct	1200
65	ggcgttaccc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tggccagctg gctgtatgc	1260
	gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaaa cagttgcgc gctgtatgg cgaatggcgc	1320
	ctgtatgcgtt attttcttcc tacgcattctg tgcggattt cacaccgcattt atgggtcact	1380



tacccagtgt gatgagcatg catggcgct tcatagttca tatgctgttt atttccttg 5400  
 agactgttct ttttgttga tagtcacccct gttgttttgtt gattcttatg caccc 5455

5 <210> 34  
 <211> 12633  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

10 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant  
 expression vector pLol14UBiBI-1

15 <400> 34  
 aattcactgg ccgtcggtt acaacgactc agagcttgc acaggaggccg atctagtaac 60  
 atagatgaca ccgcgcgcga taatttatcc tagttgcgc gctatatttt gtttctatc 120  
 gcgttattaa tgttataattg cgggactcta atcataaaaaa cccatctcat aaataacgac 180  
 atgcattaca tgtaattat tacatgctta acgttaattca acagaaaatta tatgataatc 240  
 atcgaagac cggcaacagg attcaatctt aagaaaacttt attgccaatg ttttgaacga 300  
 20 tcggggatca tccgggtctg tggcgaaac tccacgaaaa tatccgaacg cagcaagatc 360  
 tagagcttgg gtcccgctca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgtgc 420  
 gaatcgggag cggcgatacc gtaaagcaggc aggaaggcggt cagccattc gccgccaagc 480  
 tcttcagcaa tatacagggt agccaaacgct atgtctgtat agcgtccgc cacacccagc 540  
 25 cggccacagt cgatgaatcc agaaaaacggg atttttcca ccatgatatt cggcaaggcag 600  
 gcatcgccat ggtcacgac gagatctcg ccgtcgccgca tgcgcgcctt gggctggcg 660  
 aacagttcgg ctggcgag cccctgtc tcttcgttca gatcatctg atcgacaaga 720  
 ccggcttcca tccgagtagc tgctcgctg atgcgtatgtt tgcgttgggt gtcgaatggg 780  
 caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc cgcattgtat cagccatgtat ggatacttc 840  
 tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tccctggcccg gcacttcgca caatagcagc 900  
 30 cagtcccttc ccgcttcagt gacaacgtcg agcacagctg cgcaaggaaac gcccgtcg 960  
 gccagccacg atagccgcgc tgcctcgcc tgcagtccat tcagggcacc ggacaggtcg 1020  
 gtcttgacaa aaagaaccgg gccccttcg gtcgacagcc gaaacacggc ggcatacagag 1080  
 cagccgattt ctgttgcgtcc ccagctatag cggaaatagcc tctccacca agcggccgg 1140  
 35 gaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc atgcgaaacg atccagatcc ggtgcagatt 1200  
 atttggattt agagtataa tgagactcta attggatacc gaggggaaatt tatggacacgt 1260  
 cagtggagca ttttgacaa gaaatatttg cttagctgata gtgacatctt ggcactttg 1320  
 aacgcgaat aatggttct gacgtatgtt cttagctcat taaactccatc aaacccggc 1380  
 ctgagttggct cttcaacgt tgccgttctg tcagttccaa acgtaaaacg gcttgcggc 1440  
 40 cgtcatcgcc gggggcata acgtgactcc cttaaatttcc cgcgtatgtat cagattgtcg 1500  
 tttccgcct tcaagttaaa ctatcagtgt ttgacagatg cctgttgggt aataattgtc 1560  
 attagattgt ttttatgtat agatgcactc gaaatcagcc aatttttagac aagtatcaa 1620  
 cggatgttaa ttcaagtacat taaagacgtt cgcacatgtt tattaagtt tctaagcg 1680  
 aatttggtaa caccacaata tattccgc tccagccatcc aacagctccc cgaccggcag 1740  
 45 ctggcacaat aatcaccacg cgttaccacc acgcggcccg gcccgtatgg tttgaccgtg 1800  
 ttccggccca ttccggagg cgtgaagttt ggccccccgc ctaccctcac cccggcacag 1860  
 gaggccgcca aggccggagg cgtgaagttt atcgcacgcg aacagctccc cgaccggcgc 1920  
 atcgcgcacg cccgcgagct gatgaccagg cgcgcactt ggcgcacgcg ggcggctgca 1980  
 ctgcttggcg tgcattcgctc gaccctgtac cgtgaggacg cattgaccgc ggcgcacgc 2040  
 cccaccggagg ccaggcggcg cgggccttc tcaatcatcg accgcaccccg gacggccgc 2100  
 ctggcgcccg ccgagaatga acgccaagag gaacaagcat gaaacccgcac caggacggcc 2160  
 50 aggacgaacc gttttcatt accgaagaga tggggccgc tgcggctca tggaaatctg gcccgttgc 2220  
 tggtcgagcc gcccgcgcac gtctcaaccg gcttggccgc tgaagaaacc gagcggccgc 2280  
 ctgatgccaa gtcggccggc tggccggca acagcttgcg tcatgcgttc gctgcgtata 2340  
 gtctaaaag gtatgttca ttttagtaaa tggatgtatc tggatgtcg gatgatcg 2400  
 55 tgatgcgtat agtaataaaa caaatacgca agggaaacgc atgaaggta tcgctgtact 2460  
 taaccggaaa ggcgggtca gcaagacgac catcgcaacc catctagccc ggcctcgca 2520  
 aactcccccggg gccgtatgtt tggtagtgc ttccgtatccc cagggcagtgc cccgcattt 2580  
 ggcggccgtg cgggaagatc aaccgctaacc cgttgcgtgc atcgcacgcgc cgacgtatgc 2640  
 60 ccgcgcacgtg aaggccatcg gcccgcgcga cttcgtatgtt atgcacggag cggcccgaggc 2700  
 ggcggacttgc gctgtgtccg cgatcaaggc agccgacttc gtgtgttattc cgggtcagcc 2760  
 aaggcccttac gacatatggg ccacccggca cctgggtggag ctggtaagc agcgcattga 2820  
 ggtcacggat ggaaggctac aaggccgcgtt tgcgtgtcg cgggcgtatca aaggcaccgc 2880  
 catccggcggtt gaggttgcgc aggcgttgcgc cgggtacgcg ctggccattc ttgagtcccg 2940  
 tatcaccgcg cgcgtatgtt acccaggcac tggccggcc ggcacaaccc ttcttgaatc 3000  
 65 agaaccggag ggcgcacgtg cccgcgaggc ccaggcgttgc gccgctgaaa ttaaatcaaa 3060  
 actcatttga ttaatgagg taaagagaaa atgagcaaaa gcacaaacac gctaaatgtcc 3120

5	ggccgtccga	gcccacgcag	cagcaaggct	gcaacgttgg	ccagcctggc	agacacgcaca	3180
	gcccacgcac	gggtcaact	tcagttggcc	gcggaggatc	acaccaagct	gaagatgtac	3240
	gcccacgcac	aaggcaagac	cattaccggag	ctgctatctg	aatacatccg	gcagctacca	3300
	gagtaaatga	gcaaatgaat	aatagatgtag	atgaattttt	gcccgtaaag	gaggcggcat	3360
	ggaaaatcaa	gaacaaccag	gcaccgcacgc	cgtggatatgc	cccatgtgt	gaggaacggg	3420
0	cggttggcca	ggcgtaagcg	gtgggttgt	ctgcccggcc	tgcaatggca	ctgaaacccc	3480
	caagcccgag	aatcgccgt	gagcggtcgc	aaaccatccg	gccccgtaca	aatcgccg	3540
	gcccgtgggt	atgaccgtgt	ggagaagtgt	aaggccgcgc	aggccgcaca	gcggcaacgc	3600
	atcgaggcag	aagcacgcac	cggtgaatcg	tggcaagcgg	ccgctgatcg	aatccgcaaa	3660
	gaatccggc	aaccggccgc	agccgggtgc	ccgtcgatta	ggaaggccgc	caaggcgcac	3720
	gagcaaccag	atttttcgt	tccgtatgtc	tatgacgtgg	gcacccgcga	tagtcgcagc	3780
	atcatggacg	tggccgttt	ccgtctgtcg	aagctgtacc	gacgagctgg	cgaggtgatc	3840
	cgctacgagc	ttccagacgg	gcacgttagag	gtttccgcag	ggccggccgg	catggccagt	3900
	gtgtgggatt	acgacgtgtt	actgtatggcg	gtttccatc	taaccgaatc	catgaaccga	3960
15	tacccggaaag	ggaagggaga	caagccggc	cgcgttcc	gtcccacacgt	tgccgacgt	4020
	ctcaagttct	gcccggcagc	cgatggcgga	aagcagaaaag	acgacctggt	agaaacctgc	4080
	attcggtaa	acaccacgc	cggtgcatt	cagcgtacga	agaaggccaa	gaacggccgc	4140
	cttgggacgg	tatccgaggg	tgaagcctt	attagccgt	acaagatcg	aaagagcgaa	4200
	accggccggc	cggagatcat	cgagatcgag	ctagctgatt	ggatgttacc	cgagatcaca	4260
20	gaaggcaaga	accggacgt	gttgacggtt	caccggatt	acttttgc	cgatccggc	4320
	atccggccgtt	ttctctaccg	cttggcacgc	cgcggcgcag	gcaaggcaga	agccagatgg	4380
	ttgttcaaga	cgatotacga	acgcgttgc	acgcgggag	agttcaagaa	gttctgttt	4440
	accgtgcga	agctgtatcg	gtcaatgc	ctgcccggat	acgatttga	ggaggaggcg	4500
	ggcggacgtt	gcccgttct	agtcatgcgc	taccgcacc	tgatcgaggg	cgaagcatcc	4560
25	gcccgttct	aatgtacgga	gcagatgcta	ggccaaattt	ccctagccagg	ggaaaaaggt	4620
	cggaaaagggtc	tcttcctgt	ggatagcagc	tacattggga	acccaaagcc	gtacatggg	4680
	aaccggaaacc	cgtacattgg	gaacccaaag	ccgtacattt	ggaaccggc	acacatgtaa	4740
	gtgactgata	taaaagagaa	aaaaggcgat	tttccgcct	aaaactctt	aaaacttatt	4800
30	aaaactctt	aaaccgcct	ggcctgtc	taactgtct	gccagcgac	agccgaagag	4860
	ctgcaaaaag	cgcctaccct	tcggtcgt	cgccccctac	gccccggcgc	ttcgcgtcgg	4920
	cctatcgccg	ccgctggccg	ctcaaaaat	gctggcctac	ggccaggca	tctaccaggg	4980
	cgcggacaag	ccgcggccgt	gccactcgac	cgcggcgc	cacatcaagg	caccctgcct	5040
35	cgcgcgtt	ggtgtatgac	gtgaaaacct	ctgacacatg	cagctcccgg	agacggtcac	5100
	agctgtct	taagcggatg	ccgggagccag	acaagccgt	cagggcgcgt	caggggtgt	5160
	tggccgggtt	cggggcgcag	ccatgaccca	gtcacgtac	gatagcggag	tgatactgg	5220
	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgt	ctgagagtgc	accatatgc	gtgtgaaaata	5280
40	ccgcacagat	gcttaaggag	aaaataccgc	atcaggcgct	cttccgc	ctcgctca	5340
	gactcgctc	gttcgtcgt	tcggctgc	cgagcggat	cagctact	aaaggcggta	5400
	atacggttat	ccacagaatc	agggataac	gcaggaaaaaa	acatgtgac	aaaaggccag	5460
	aaaaaggcca	ggaaccgtaa	aaaggccgc	tttctccat	actatcgct	tgagtccaa	5820
45	cctgacgagc	atcacaaaaaa	tcgacgc	agttagggat	ggcgaacccc	gacaggacta	5580
	taaagatacc	aggcggttcc	ccctggaa	tcctctgt	tccgaccctg	5640	
	cgcgttaccg	gatacgtc	cgccttctc	ccttcggaa	gcgtggcg	ttctcata	5700
	tcacgctgt	ggtatctcg	ttcgtgttag	gtcgttgc	ccaagctgg	ctgtgtgcac	5760
	gaacccccc	ttcagccgaa	ccgctgc	ttatccggta	actatcgct	tgagtccaa	5820
50	ccggtaagac	acgacttac	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	5880
	aggtatgtag	gcccgtac	agagttctt	aagtgggtgc	ctaactacgg	ctactacta	5940
	aggacagtat	ttgttatctg	cgctctgt	aagccaggta	ccttcggaa	aagagtgg	6000
	agctttgtat	ccggcaaaaca	aaccacgcgt	gttagcgggt	gttttttgc	ttgcaagcag	6060
	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctaa	aaagatcctt	tgatctttc	tacgggtct	6120
55	gacgctcgt	ggaacgaaaa	ctcaggtaa	gggattttgg	tcatgc	tatatctccc	6180
	aattttgtgt	gggttattt	tgcacgc	aaaataataa	aagcagactt	gacctgatag	6240
	ttttggctgt	agcaattat	tgcttagtgc	atctaacgc	tgagttaa	cgcggccgcga	6300
	agcggcgct	gcttgaacga	atttctagct	agacattatt	tgccgactac	cttgggtatc	6360
60	tcgccttca	cgttgtggac	aaatttcttcc	aactgtatct	cgcgcgaggc	caagcgatct	6420
	tcttcttgc	caagataa	ctgtctagct	tcaagtatga	cgggctgtata	ctggccggc	6480
	aggcgcttca	ttggccagtc	ggcagcgcaca	tccttcggcg	cgattttgc	gttactcg	6540
	ctgtacccaa	tgccggacaa	cgtaagcact	acatttcgt	catcgcc	ccatcgccgg	6600
65	ggcgagtcc	atagcgtaa	ggtttcattt	agcgcctcaa	atagatctg	ttcaggaaacc	6660
	gtatcaaa	gttctccgc	cgctggac	accaaggcaa	cgctatgttc	tcttgcttt	6720
	gtcagcaaga	tagccat	aatgtcgatc	gtggctggct	cgaagatacc	tgcaagaat	6780
	tcattgcgt	gcoattctcc	aaattgc	tgcgtgttag	ctggataa	ccacggaaat	6840
	atgtcgct	gcaacaacaat	ggtgacttct	acagcgcgga	gaatctcg	ctctccaa	6900
	gaagccgaag	tttccaaaag	gtcgtgtatc	aaagctcgcc	gctgtgtt	atcaaggc	6960
	acggtcaccc	taaccagcaa	atcaatatca	ctgtgtggct	tcaggccgc	atccactcg	7020
	qaqccgtaca	aatgtacggc	cagcaacgtc	gtttcgagat	ggcgtcgat	gacgccaact	7080

5	acctctgata	gttgagtcga	tacttcggcg	atcacccgctt	cccccatgat	gtttaacttt	7140
	gttttagggc	gactggccctg	ctgcgtaaaca	tcgttgctgc	tccataaacat	caaacatcga	7200
	cccacggcgt	aacgcgttgc	ctgcttggat	gccccaggca	tagactgtac	cccaaaaaaaa	7260
	cagtataac	aaggcatgaa	aaccgcact	gccccgggtc	catggacata	caaatggacg	7320
	aacggataaa	cctttcacg	ccctttaaa	tatccgatta	ttctaataaa	cgctcttttc	7380
	tcttaggtt	acccgcaat	atatccgtc	aaacactgt	agtttaact	gaaggcggga	7440
	aacgacaatc	agatctaga	ggaaacagct	atgaccatga	ttacgccaag	cttgcgtgc	7500
	tgcaggtcga	ctctagagga	tcgatccccg	ggtaggtcag	tcccttatgt	tacgtctgt	7560
	agaaaacccc	acccgtgaaa	tcaaaaaact	cgacggctcg	tgggcattca	gtctggatcg	7620
	cggaaaactgt	ggaattggtc	agcgttggtg	ggaaaaggcg	ttacaagaaa	gcgggcaat	7680
	tgctgtgcca	ggcagtttta	acgatcagt	cgccatgc	gatattcgta	attatgcggg	7740
	caacgtctgg	tatcagcgcg	aagtctttat	accgaaagggt	tgggcaggcc	agcgtatcgt	7800
	gctgcgttcc	gatgcggtca	ctcattacgg	caaagtgtgg	gtcaataatc	aggaagtgtat	7860
	ggagcatcag	ggcggctata	cgccatttga	agccgatgtc	acgcccgtatg	ttattgcccgg	7920
	gaaaagtgt	cgtaagtttc	tgcttctacc	tttgatata	atataataat	tatcattaat	7980
	tagtagtaat	ataatatttc	aaatattttt	ttcaaaataa	aagaatgtag	tatatacgaa	8040
	ttgctttct	gtagtttata	agtgtgtata	ttttaattta	taactttct	aatatatgc	8100
	caaaaatttg	tgatgtcag	gtatcacgt	ttgtgtgaac	aacgaactga	actggcagac	8160
	tatccgccc	ggaatgggt	ttaccgacga	aaacggcaag	aaaagcagt	cttacttcca	8220
	tgatttctt	aactatggcg	gaatccatcg	cagcgtatg	ctctacacca	cgccgaacac	8280
	ctgggtggac	gatatcaccg	tggtgacgc	tgtcgcgaa	gactgttaacc	acgcgtctgt	8340
	tgactggcag	gtggggcca	atggtgatgt	cagcgttga	ctgcgtgatg	cgatcaaca	8400
	ggtgggtgca	actggacaag	gcactagcgg	gactttgca	gtggtaatc	cgcacctcg	8460
	gcaacccgg	gaaggttatac	tctatgaact	gtgcgtcaca	gccaaaagcc	agacagagtg	8520
	tgatatactac	ccgcttcgcg	tcggcatccg	gtcagtgcc	gtgaagggcg	acagttcct	8580
	gattaaccac	aaaccgttct	acttactgg	cttgggtcg	catgaagatg	cggtatttgcg	8640
	tggcaaagga	ttcgataacg	tgctgtatgg	gcacgaccac	gcattaatgg	actggatttg	8700
	ggccaaactcc	taccgtacct	ttgatgaaac	ttacgctgaa	gagatgtcg	actggggcaga	8760
	tgaacatggc	atcggtgtga	ttgatgttac	tgtcgtgtc	ggctttaacc	tctcttttagg	8820
	cattggttc	gaagcgggca	acaagccaa	agaactgtac	agcgaagagg	cagtcacacgg	8880
	ggaaaactcg	caagcgaact	tacaggcgat	taaagagctg	atagcgcgt	acaaaaaacca	8940
	cccaagcgt	gtgtatgtga	gtattgcca	cgaaccggat	acccgtccgc	aaggtgcacg	9000
	ggaatatttc	gcccactgg	cggaagcaac	cgtaaaactc	gaccggacgc	gtccgatcac	9060
	ctgcgtcaat	gtaatgttct	gcgacgctca	caccgatacc	atcaggatc	tctttgatgt	9120
	gctgtgcgt	aaccgttatt	acggatggta	tgtccaaagg	ggcgatttgg	aaacggcaga	9180
	gaaggtactg	aaaaaagaac	ttctggctg	gcaggagaaa	ctgcatcagc	cgattatcat	9240
	caccgaatac	ggcgtggata	cgttagccg	gtgcactca	atgtacacccg	acatgtggag	9300
	tgaagagtat	cagtgtgc	ggctggat	gtatcaccgc	gtctttgatc	gcgtcagcgc	9360
	cgtcgtcggt	gaacaggat	ggaatttcg	cgattttgc	acctcgc	gcatatttgc	9420
	cgttggcggt	aacaagaaaa	ggatcttac	tgcgcacgc	aaaccgaagt	cggggcctt	9480
	tctgctgca	aaacgctgg	ctggcatgaa	cttcggtgaa	aaaccgcacg	agggaggcaa	9540
	acaatagag	ctcgaattt	cccgcgttgc	caaacattt	gcaataaaagn	ttcttaagat	9600
	tgaatccgt	tgccggctt	gcgatgatta	tcatataatt	tctttgat	tacgttaagc	9660
	atgtataat	taacatgtaa	tgcatgacgt	tattttatgag	atggggtttt	atgatttagag	9720
	tcccgcaatt	atacattt	tacgcgatag	aaaacaaaat	atancgcgc	aactaggata	9780
	aattatcg	cgcgggtgtca	tctatgttac	tagatcggg	attcccatgc	ctcgaggatc	9840
	taacatgct	agatacatga	agtaacatgc	tgctacgg	taataattt	tgagttgatt	9900
	tttactggta	cttagataga	tgtatataca	tgcttagat	catgaagtaa	catgctcc	9960
	cagttcc	aatcattt	gagtcctat	atatttata	aaatcgtat	gttttaaatt	10020
	attttgatt	tactggact	tagatagat	tatatacata	tgctcaaaca	tgcttagata	10080
	catgaagtaa	catgtgc	cggtttgc	attatttgat	gcctataatt	tctaataat	10140
	cagttatgtt	taaattt	tgattttact	gttacttga	tagatgtata	tatacatgt	10200
	caaacatgt	tagatacat	aagtaatatg	ctactacgt	ttaatttgc	ttgagtac	10260
	atatttctt	ataaaatcgt	atgtttaaa	ttatccgt	tttactggta	cttagataga	10320
	tgtatata	catgttgc	tacatgaat	aacatgtac	tacgtttaa	ttgttcttgc	10380
	atacctata	attctaataa	atcgtatgt	tttaaattt	ttcgat	ctggtactt	10440
	gatagatgt	tatatacat	ctcgaacat	tttagataca	tgaagtaaca	tgctacat	10500
	atattataat	aaatcgtat	gtctttaatt	attttgc	tactgttact	tagatagatg	10560
	tatatacat	ctcaaacat	tttagataca	tgaagtaaca	tgctactacg	gtttaatcat	10620
	tattgagtac	ctatattt	taataat	gtatgtttc	aatttttttgc	attttactgg	10680
	tacttagata	tatgttata	tacatgc	aacatgtta	gatacgtaa	gtaacatgt	10740
	actatgtt	atgttctt	agtacactata	tatttata	aatcgtat	ttttaaatta	10800
	tttcgattt	actggactt	agataatgt	atatacat	gctcgaacat	gcttagat	10860
	atgaagtaac	atgtactac	ggtttaatcg	ttcttgat	cctatataatt	ctaataaaatc	10920
	agtatgtctt	aaattatctt	gattttactg	gtacttagat	agatgtata	acatgcctt	10980
	atacatgtaa	taacatgtca	ctatgattt	atcggttctt	agtacactata	tatttataata	11040

aatcagttatg ttttaatta ttttgatttt actggtaactt agatagatgt atatatacat 11100  
 gctcgAACat gcttagatac atgaagtaac atgtactac ggtttaatca ttcttgagta 11160  
 cctatataatt ctaataaaatc agtatgttt taattatttt gatattactg gtacttaaca 11220  
 tgTTtagata catcatatacg catgcacatg ctgtactgt ttaatcatc gtgaataacct 11280  
 5 atatattctt atatatacgat atgtcttcttta attattatga ttttgatgtt cttgtatgtt 11340  
 ggcataatgtt gcaatgtt gtagatttt aatacccgat gtgatgagca tgcattggcgc 11400  
 cttccataggat catatgtgtt ttatccctt tgagactgtt ctttttggat gatagtcacc 11460  
 ctgttgggggtt gtgattctt tgcacccggg gatcctctag agtcgacctg caggcggccg 11520  
 10 cactgtgtt taggattcca acgcgagccg gacaagcgaa ggaaccttgc gtgcgaggcg 11580  
 aggccgcccc gctccgattt gattcgacgc gcaggcgcag ggcgcaggat ggacgccttc 11640  
 tactcgaccc cgtcgccggc ggcgagccggc tggggccacg actccctcaa gaaatccgc 11700  
 cagatctccc cccggctgca gtcacccctc aagctcggtt acctgactct atgctttgca 11760  
 ctggcctcat ctggcggtggg tgcttacca cacattggcc tgaacatcg gggatgctg 11820  
 acaatgctcg ctgtgtcgaa aactatcgcc tggatgttctt cggtgccagt ctatgaggag 11880  
 15 aggaagaggt ttgggtgtt gatgggtca gcccctctgg aaggggcttc gtttggaccc 11940  
 ctgattggac ttggcataga ctttgacccca agcatcctcg tgacagggtt tgctggacc 12000  
 gccatcgcc ttgggtgtt ctctggccg gccatcatcg ccaagcgcag ggagtacctg 12060  
 tacatcggtt gctgtctc gtcgtggctg tcgatcctcg tctggctgca gtttgcac 12120  
 20 tccatctttt gcaactcctc tggcagcttc atgtttgagg ttactttgg cctgttgatc 12180  
 ttccctgggtt acatgggtt gacacacgcag gagatcatcg agagggcga ccatggcgc 12240  
 atggactaca tcaaggcacgc ctcacccctc ttcacccgtt ttgttggctt ctcgtccga 12300  
 gtcctcatca tcatgtctaa gaacgcaggc gacaaggctgg aggacaagaa gaagagggaa 12360  
 aggggggtcctt gaaacgtwtctt cccgcacatg tagataccgt caccgcgtg acctgcaggc 12420  
 atgcccgcgtt aaatcaccaggt ttcacccatca caaatctatc tctctatcaa taatgtgtga 12480  
 25 gtagttccca gataagggaa tttaggttctt tataagggtt cgctcatgtt ttgagcatat 12540  
 aagaaacccct tagatgtat ttgtatgtt aaaaacttca tatcaataaa atttctaatt 12600  
 cctaaaaccca aaatcccgatg ggtaccgagc tcg 12633

30 <210> 35  
 <211> 5598  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

35 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant  
 expression vector pOXoBI-1

40 <400> 35  
 ggggatcctc tagatcgac ctgcaggccg cgcactagt gattaggatt ccaacgcgag 60  
 ccaggacaag cgaggaacct tgcgtgcgg gcgaggccgc cccgctccga ttgcattcg 120  
 cgcgcaggcg caggcgccagg gatggacgc ttctactcgat cctcgtcggc ggcggcgagc 180  
 ggctggggcc acgactccctt caagaacttc cgcgcaggatctt ccccccgggt gcagtcggcc 240  
 ctcaagctcg ttacatcgatc tctatgtttt gcactggcctt catctggcgat ggggtgttac 300  
 45 ctacatcgatc ccctgaacat cggccggatgc ctgacaatgc tcgcttgcgtt cggaaactatc 360  
 gcctggatgt ttcgtgttcc agtctatcgatc gagaggaaga ggttgggtt gctgtatgggt 420  
 gcaaggccatcc ttggaaaggggc ttcgggttggc cctctgttcc agcttgcac 480  
 ccaagcatcc tcgtgacagg gtttgcggat cccgcacatcg cctttgggtt cttctctggc 540  
 gcccgcacatca tcgccaaggcg caggaggatc ctgtacatcg tggcgtgtt ctcgtctggc 600  
 ctgtcgatcc tgctctggctt gcaatgggtt acgtccatctt tggccactc ctctggcagc 660  
 50 ttcatgtttt aggtttactt tggctgttgc gacatggactt acatcaagca cgcgcacatcg 720  
 caggagatca tcgagaggccg gcacccatggc ctagtctca tcatcatgtt caagaacgc 780  
 ctcttcaccc actttgttgc cgttcctcgat ctttgcacatcg ttcgttgcgtt ctcgtctggc 840  
 ggcgcacatcg cggaggacaa gaagaagagg aagaggggtt cctgaacgtt ttcggccac 900  
 55 atgttagatac cgtcaccgcg tcgacatcgatc ggcaccccg ctgaaatcactc cagtcgttctt 960  
 ctacaaatct atctctctca taataatgtt tgatgttcc ccaagataagg gaattagggt 1020  
 tcttataatggg tttcgctcat gtgttggatc tataagaaac ctttagatgtt tatttgtatt 1080  
 tgtaaaatatac ttctatcaat aaaatttctt atccctaaaaa cccaaatccca gtgggttaccg 1140  
 agctcgaaatt caagcttgc actggccgtt ctttacacatcg ttttacaac gtcgtactg gggaaacccct 1200  
 60 ggcgttaccc aacttaatcg ccttcgcagca catccccctt tcgccagctg gctgtatagc 1260  
 gaagaggccc gcacccatcg ccctcccaat cagttgcgcg gctgtatgg cgaatggcgc 1320  
 ctgtcggtt attttctctt taatcgatcg tgcgttattt cacaccgcgtt atgggtgcact 1380  
 ctcactacaa ttcgtctcgat tgccgcatacg ttaagccagc cccgcacaccc gccaacaccc 1440  
 gctgacgcgc cctgcacggc ttgtctcgat cccgcacatcg cttacagacaa agctgtgacc 1500  
 65 gtcctccggaa gctgcgtgtt tcagagggtt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga 1560  
 aaggccctcg tgataacgcctt atttttagt gttaatgtca tgataataat gttttcttag 1620

5	acgtcagggtg	gcactttcg	gggaaatgtg	cgcgAACCC	ctatttgttt	atTTTCTAA	1680
	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaaatgct	tcaataataat	1740
	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	ctttttgcg	1800
	gcattttgc	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaaagtaaa	agatgctgaa	1860
	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	taagatcctt	1920
10	gagagtttc	gccccgaaga	acgtttcca	atgatgagca	cttttaaagt	tctgctatgt	1980
	ggcgcggat	tatccgtat	tgacccggg	caagagcaac	tcggtcggc	catacactat	2040
	tctcagaatg	acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	ggatggcatg	2100
	acagaatag	aattatgcag	tgctgcccata	accatgagtg	ataacacttc	ggccaaacttca	2160
	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	tttgcacaa	catggggat	2220
15	catgtactc	gccttgcattc	ttggaaaccc	gagactatgca	aagccatacc	aaacgacgag	2280
	cgtgacacca	cgatgcctgt	agcaatgca	acaacgttgc	gcaaactatt	aactggcgaa	2340
	ctacttactc	tagttcccg	gcaacaattt	atagacttgg	tggaggcgg	taaagttgca	2400
	ggaccatcc	tgcgctcgcc	ccttccggct	ggctggttt	ttgctgat	atctggagcc	2460
	ggtgagcgt	ggtctcgccg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	gccctcccg	2520
20	atcgtagtt	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	tagacagatc	2580
	gctgagatag	gtgcctcact	gattaaggat	tggttaactgt	cagaccaatg	ttactcatat	2640
	atactttaga	ttgatttaaa	acttcattt	taatttaaaa	ggatcttagt	gaagatcctt	2700
	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagttt	cgttccactg	agcgtcagac	2760
	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatcctttt	ttctgcgcgt	atatctgctc	2820
25	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagg	tggtttgtt	tgccgatca	agagctacca	2880
	actcttttc	cgaaggttac	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	ataccctcgct	2940
	gtgttagccgt	agttaggcca	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	tacccgggtt	3060
	ctgctaatcc	tgtttaccagt	ggataaggcg	cagcggcgg	gctgaacggg	gggttcgtgc	3120
	gactcaagac	gatagttacc	aacgaccatc	accgaactga	gataccatac	gcgtgagctt	3180
	acacagccca	gcttggagcg	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccgg	aaggcggcagg	3240
30	tgagaaaagcg	ccacgcttcc	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	tctttatagt	3300
	gtcggaaacag	gagagcgcac	ctgacttgag	cgtcgattt	tgtgtatgctc	gtcagggggg	3360
	cctgtcggtt	ttcgccacct	cagcaacgcg	gccttttac	ggttcctggc	ctttgtctgg	3420
	cgagacctat	ggaaaaacgc	tcttcgtc	tccctgtatt	ctgtggataa	ccgtattacc	3480
	ccttttgc	acatgttctt	cgctcggcgc	agccgaacga	ccgagcgcag	cgagtca	3540
35	gcctttgagt	gagctgtatc	cccaatacgc	aaaccgcctc	tcccgcgcg	ttggccgatt	3600
	agcggagaa	cggaaagagcg	caggttccc	gactggaaag	cgggcagtga	gcccacgc	3660
	cattaatgca	gctggcacga	tcattaggca	ccccaggctt	tacacttat	gcttcggcgt	3720
	attaatgtga	gttagctcac	gagcggataa	caatttcaca	caggaaacag	ctatgacccat	3780
	cgtatgtgt	gtgaaattgt	cgagcagaaa	gatataat	gtaaaaaaaaat	gggtctat	3840
40	gattacgaat	tcccatgcct	cgagcagaaa	gatataat	gtaaaaaaaaat	ccagaatata	3900
	atatggaaagg	tttcaggaag	acaaagggtt	tagaaacttc	caaaaaaaaaat	ccaaaaagcc	3960
	ttttggaaaga	aataccctct	tgggttggcc	ccggcgcagc	ccctagtgg	cgggcttta	4020
	acgatcta	cccggtctaa	ttggtaat	atgttagact	tctaattttaga	caactaggct	4080
	tgccggctca	atggtctaa	ttgattttaa	atcctaatta	aatatgaacg	tgccggatca	4140
45	tcccctct	ctagtttct	cggagcttt	tttcatggac	cttgaagtat	gattggtaga	4200
	ctacttcgg	actctgtggat	acttcagat	gcacatctac	tttgaatctt	tgccatgttt	4260
	tcatctcgg	gaaattctca	cagttggag	gtataaccag	ttgcccggaaat	tgccggagcc	4320
	cactcacagc	caggatcagc	ccatgtccca	aggcaaccct	tgtactaca	ttaaatgttg	4380
	tgactactt	gggcctcg	ccctgcattt	ttgcatgttc	atgtacacg	cctacaat	4440
50	agagaaaatag	attactaaat	atcaccatt	tggttatttc	agatgagat	aaaagaactc	4500
	gtataccgaa	aaatgtattt	taaactgtgg	taggtgagaa	agatcttta	gtctttttt	4560
	tacgtatact	ccccccctccc	aatcccccatt	caggtttgtt	agacactttc	taataaaat	4620
	gccgaatttt	aaccgttaat	ttgacttaga	aaaataagtt	atactgaatg	gatcacggc	4680
	cgtacattcg	gatgttggag	acaggagag	gctggctgg	gcccgtggat	aagtttcgt	4740
55	agaaaatctg	acttgcacac	ccacaggccc	gttgatttgc	actgacaacc	gaaaggcaag	4800
	tgtttcgct	gtccatattt	ttccgcgatc	gaatattttaa	actgcgagga	accccttcgt	4860
	caggcgc	tatcagcact	tgatcactca	ctgatcgatc	agtagtagcc	tttcttcgt	4920
	cgccgacgt	ttatataattt	ttggcaacaa	gtcatcgatt	gagaacagaa	acaaaaacaaag	4980
60	aagagaacta	tttggagagag	agtagttacg	ccgcagcgg	tagccttcca	tttctgacga	5040
	tcatgcccata	cgataaacc	gcccggcggc	agaccaggat	gcaagggttga	aatgccaaca	5100
	catgtcg	tcatttctcg	gtcttttcat	tttgcattgtc	gtcatcgatc	ccctggacac	5160
	tgacatttct	ctcttttgc	gttgaatgaa	gaccctaaacc	tttccaccatc	agcacgcccc	5220
65	tcaacttgc	aaggcttagac	gaaaccatca	tgcatgattt	atgagtaatg	gtgtgcacga	5280
	atattatgaa	cccggtttca	agagcaat	tccatttgc	tacacccct	ccttgcattct	5340
	gttctgtgt	ccatatttca	tagcagccgg	cagtggcctt	gactctgact	gccacgc	5400
	taatataatct	ttaataaaact	cgctgcctt	tttcgtgtgt	ccatttgc	atgcatgc	5460
	tgacgacat	cacatgcata	gcttaattttag	ctccatgc	ccactgc	cattaaatccc	5520
70	ctatataaaag	gactccat	gcctcaccat	tcactcatcc	accacagctt	agcagcagca	5580
	acaaccatgt	ccatagacac	tctccatcaa	caaactctag	ctgatcaatc	ctagcta	5640

ttattacata gcaagccc

5598

5 <210> 36  
 <211> 12776  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

10 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant expression vector pLo1140XoBI-1

15 <400> 36  
 aattcaactgg ccgtcggttt acaacgactc agagcttgac aggaggcccg atctagtaac 60  
 atagatgaca cccgcgcgca taatttatcc tagttgcgc gctatatttt gtttctatc 120  
 gcgtattaaa tgtataattt cgggactcta atcataaaaaa cccatctatc aaataacgtc 180  
 atgcattaca tggtaattat tacatgctta acgttaattca acagaaatattt tatgataatc 240  
 atcgcacac cggcaacagg attcaatctt aagaaactttt attgccaatc gtttgaacga 300  
 tcgggatc tccgggtctg tggcgggaaatccacaaaaat tattccgaacg cagcaagatc 360  
 20 tagagcttgg gtcccgctca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgtgc 420  
 gaatcgggag cggcgatacc gtaaaagcagc aggaagcggc cagcccatcc gccgccaagc 480  
 tcttcagcaa tatcacgggt agccaacgcg atgtcctgtatc agcgggtccgc cacacccagc 540  
 cggccacagt cgatgaatcc agaaaaagcgg ccattttcca ccatgatattt cggcaagcagc 600  
 25 gcatcgccat gggtcacgac gagatcctcg ccgtcggttca tgcgcgcctt gaggctggcg 660  
 aacagttcgg ctggcgcgag cccctgatgc tcttcgttca gatcatctt atcgacaaga 720  
 cccgcttcca tccgagatcg tgcgcgttcg atgcgtatgtt tgcgttgggt gtcgaatggg 780  
 caggtagccg gatcaagcgt atgcgcgcg cgcattgtatc cagccatgtatc ggtactttc 840  
 tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tcttgcggcc gcaactcgcc caatagcagc 900  
 30 cagttccctc cgcgttcctgatc gacaacgtcg agcacagctg cgcgaaggaaac gcccgtcg 960  
 gcccggccacg atagccgcgc tgcctcgatcc tgcaggatcatc tcaggggcacc ggacaggtcg 1020  
 gtcttgacaa aaagaacccgg ggcgcgcgc gctgacagcc ggaacacgcgc ggcacatcagag 1080  
 cagccgatttgc tcttgcgttgc ccagtcatag ccgaatagcc tctccaccca agcggccgg 1140  
 gaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc atgcgaaacg atccagatcc ggtgcagatt 1200  
 35 atttggattt gagatgaaata tgagactcta attggataacc gaggggaaattt tatggaacgt 1260  
 cagttggagca tttttgacaa gaaatattttt ctatgtatgtt ctatgtatc taaaactccag aaacccgcgg 1320  
 aacgcgcaat aatggtttctt gacgtatgtt ctatgtatc taaaactccag aaacccgcgg 1380  
 ctgagttggc ccttcaacgt tgcgttgcggcc agtgcgtatcc tcaatttctc cgcgtatgtatc gatattgtcg 1440  
 40 cgtcatcgcc ggggttcata agtgcgtatcc tcaatttctc cgcgtatgtatc gatattgtcg 1500  
 tttccgcctc tcgtttaaaa ctatcatgtt ttgacaggat cctgttgcgtt aataattgtc 1560  
 attagattgt ttttatgtatc agatgcactc gaaatcagcc aatttttagac aagtagatcaa 1620  
 cggatgttaa ttcaatgtatc taaagacgtc cgcaatgtgt tattaatgtt tctaagcg 1680  
 aattttgtta caccacaata tattccgttca ccagccagcc aacagctccc cgaccggcag 1740  
 ctcggcacaa aatcaccacg cgttaccacc acgccccccg gccgcattgtt gttgaccgtg 1800  
 45 ttccggggca ttgcgcgttgcgatcc cttatcatgtt accgcaccccg gagcggggcgc 1860  
 gaggccgcac agggccgagg cgtgaagttt ggcggccgccttccatc cccggccacag 1920  
 atcgcgcacg cccgcgacttgcgttgcgatcc gacggccgcac ggcggctgc 1980  
 ctgttggcgcc tgcgtatccgc gaccctgtatcc cgcgcacttgcgttgcgatcc ggaagtgcacg 2040  
 50 cccacccggc ccaggccggcg cgggtgcgttc cttatcatgtt accgcaccccg gagcggggcgc 2100  
 ctggcggcccg ccgagaatgtt acgccaagag gaaacaagcat gaaaccgcac caggacggcc 2160  
 aggacgaacc gtttttcatc accgaagaga tcgaggccga gatgtatcgatc gcccgggtacg 2220  
 tggtcgagcc gcccgcgcac gtcgtatccgc tggcgctgc tggatccatc gcccgggttgc 2280  
 ctgtatccgc gctggccgc tggccggccatc gcttggccgc tggatccatc gcccgggttgc 2340  
 gtcttaaaaatgttgcgttgc ttttgcgttgc gatgtatccgc tggatccatc gcccgggttgc 2400  
 55 taaccagaaaa ggcgggtcgatcc gcaagacgcac catcgatccatc gatctatccgc 2460  
 actcgcgggg gccgtatccgc tggatccatc gatgtatccgc tggatccatc gcccgggttgc 2520  
 ggcggccgtg cgggaagatcc aaccgcataac cttatcatgtt accgcaccccg gagcggggcgc 2580  
 ccgcgcacgtg aaggccatcg gccggccgcgc tggatccatc gatgtatccgc tggatccatc 2640  
 60 ggcggacttg gctgtgtccgc cgtatccgc gatgtatccgc tggatccatc gcccgggttgc 2700  
 aagcccttac gacatatggg ccaccgcgc gcttggccgc tggatccatc gatgtatccgc 2760  
 ggtcacggat ggaaggctac aacgcggccatc tggatccatc gatgtatccgc tggatccatc 2820  
 catcggcggt gagggttgcgc aggcgcgtgc gcttggccgc tggatccatc gatgtatccgc 2880  
 tatcacgcac cgcgtatccgc acccaggacatc tggatccatc gatgtatccgc tggatccatc 2940  
 agaaccgcac ggcgcacgtg cccgcgcgttgc gatgtatccgc tggatccatc gatgtatccgc 3000  
 65 actcatttgc gttatgttgc taaagagaaaaatgacaaatc gatgtatccgc tggatccatc 3060  
 ggcggccgtg cgcacgcac gacaaatc gatgtatccgc tggatccatc gatgtatccgc 3120  
 ggcggccgtg cgcacgcac gacaaatc gatgtatccgc tggatccatc gatgtatccgc 3180

	gccatgaagc	gggtcaactt	tcagttcccg	gcggaggatc	acaccaagct	gaagatgtac	3240
	gcccgtacgcc	aaggcaagac	cattaccgag	ctgctatctg	aatacatcgc	gcagctacca	3300
	gagtaaatga	gcaaataatga	aaatgagtag	atgaaatttt	gcggctaaag	gaggcggcat	3360
5	ggaaaatcaa	gaacaaccag	gcaccgacgc	cgtggaatgc	cccatgttg	gaggaacggg	3420
	cggttggcca	ggcgttaagcg	gctgggttgc	ctggccggcc	tgcaatggca	ctggaaacccc	3480
	caagccccag	aatcgccgt	gagccgtcgc	aaaccatccg	gcccggtaca	aatcgccgcg	3540
	gcgctgggtg	atgaccttgt	ggagaagttt	aaggccgcgc	aggccgccc	gcggcaacgc	3600
	atcgaggcag	aagcacgccc	cggtaatcg	tggcaagcgg	ccgctgatcg	aatccgcaaa	3660
	gaatcccccgc	aaccgcggc	agccggtgcg	ccgtcgatta	ggaagccggc	caagggcgac	3720
10	gagcaaccag	atttttcg	tccgtatcgc	tatgacgtgg	gcacccgcga	tagtcgcagc	3780
	atcatggcg	tggccgttt	ccgtctgtcg	aagcgtgacc	gacgagctgg	cgaggtgatc	3840
	cgctacgacg	ttccagacgg	gcacgttagag	gttcccgag	gcggccggcc	catggccagt	3900
	gtgtgggatt	acgaccttgt	actgatggcg	gttcccatc	taaccgaatc	catgaaccga	3960
	tacccggaaag	ggaagggaga	caagccggc	cgcgtgttcc	gtccacacgt	tgcggacgta	4020
15	ctcaagttct	gccggcgagc	cgatggcgga	aagcagaaaag	acgaccttgt	agaaacactgc	4080
	attcggttaa	acaccacgca	cggtccatcg	cagcgtacga	agaaggccaa	gaacggccgc	4140
	ctgggtacgg	tatccgaggg	tgaagccttg	attagccgt	acaagatcg	aaagagcgaa	4200
	accggccggc	cggagtacat	cgagatcgag	ctagctgatt	gtatgtaccc	cgagatcaca	4260
	gaagggcaaga	aaccggacgt	gctgacgggt	cacccggatt	actttttgt	cgatccggc	4320
20	atcgccgtt	ttctctaccc	cctggcacgc	cgcgcgcag	gcaaggcaga	agccagatgg	4380
	ttgttcaaga	cgtatctacg	acgcagtggc	agcgcggag	agttcaagaa	gttctgtttc	4440
	accgtgcgca	agctgatcg	gtcaaatgac	ctgcccggat	acgattttga	ggaggaggcg	4500
	gggcaggctg	gcccgtatcc	agtcatgcgc	taccgcaacc	tgatcgaggg	cgaagcatcc	4560
	gccggttcct	aatgtacgga	gcagatgcta	gggcaatttgc	ccctagcagg	ggaaaaaaggt	4620
25	cggaaaaggtc	tcttccttgt	ggatagcagc	tacattggga	acccaaagcc	gtacattggg	4680
	aaccggaaacc	cgtacatttg	gaacccaaag	cggtacatttgc	gaaaccggc	acacatgtaa	4740
	gtgactgata	taaaagagaaa	aaaaggcgat	tttccgcct	aaaactctt	aaaacttatt	4800
	aaaacttta	aaaccggcct	ggcctgtgca	taactgtctg	gccagcgcac	agccgaagag	4860
	ctgcaaaaag	cgcctaccct	tcggctgcgt	cgtccctac	gccccggcgc	ttcgcgtcgg	4920
30	cctatcgcg	ccgctggccg	ctaaaaaatg	gtggccctac	gcccaggcaa	tctaccaggg	4980
	cgcgacaaag	ccgcgcgcgtc	gccactcgac	cgcggcgcc	cacatcaagg	caccctgcct	5040
	cgcgcgttcc	ggtgtatgacg	gtgaaaaaccc	ctgacacatg	cagctccccc	agacggtcac	5100
	agcttgtctg	taagcggatg	ccggggagcag	acaagccgt	cagggcgcgt	cagcgggtgt	5160
	tggccgggtgt	cgggggcgcag	ccatgacccca	gtcacgtac	gatagcggag	tgtatactgg	5220
35	cttaactatg	cggcatcaga	gcagatttgc	ctgagagtgc	accatatgcg	gtgtgaaata	5280
	ccgcacagat	gcgttaaggag	aaaataaccgc	atcaggcgct	tttccgcttc	ctcgctca	5340
	gactcgctgc	gctcggtcgt	tcggctgcgg	cgagccgtat	cagtcactc	aaaggcggta	5400
	atacgggtat	ccacagaatc	agggataatc	gcaggaaaaga	acatgtgac	aaaaggccag	5460
	caaaaaggcc	ggaacccgtaa	aaaggccgc	ttgctggcgt	ttttccatag	gtccggcccc	5520
40	cctgacgagc	atcacaaaaaa	tcgacgctca	agtcaagggt	ggcgaaacc	gacaggacta	5580
	taaagataacc	aggcgttcc	ccctggaaagc	tccctcgatc	gtctccctgt	tccgaccctg	5640
	ccgcattaccg	gatacctgtc	cgcccttctc	ccttcggaa	gcgtggcgt	ttctcatagc	5700
	tcacgctgt	ggtatctcag	ttcgggttag	gtcgttcgt	ccaaagctgg	ctgtgtgcac	5760
	gaacccccc	ttcagccga	ccgctgcgc	ttatccgt	actatcgct	tgagtccaa	5820
45	ccggtaagac	acgacttac	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	5880
	aggatgtatg	gcgggtgtac	aggttctttg	aagtggggc	ctaactacgg	ctacactaga	5940
	aggacagtat	ttggatctcg	cgctctgtcg	aagccagtt	ccttcggaaa	aagatgttgt	6000
	agctcttgc	ccggcaaaaca	aaccaccgt	gtttagccgt	tttttttgt	ttgcaagcag	6060
	cagattacgc	gcagaaaaaaa	aggatctaa	gaagatctt	tgatctttc	tacgggtct	6120
	gacgctcgt	ggaacggaaaa	ctcacgtt	gggattttgg	tcatgcatg	tatatctccc	6180
	aatttgcgt	gggcttattt	tgacacgctt	aaaataataa	aagcagactt	gacctgtatg	6240
	tttggctgt	agcaattatg	tgcgttagtgc	atctaactcg	tgagttaa	cgccgcgcga	6300
	agcggcgtcg	gcttgaacga	atttcttagct	agacattatt	tgccgactac	tttgggtatc	6360
	tcgccttca	cgtgtggac	aaattcttcc	aactgatctg	cgccgcgaggc	caagcgatct	6420
55	tcttcgtc	caagataagc	ctgtctagct	tcaagatgt	cgggctgtata	ctggggccggc	6480
	aggcgttca	ttgcccgtc	ggcagcgcaca	tccttcggcg	cgattttgc	gttactgcg	6540
	ctgtacccaa	tgccggacaa	cgtaaagact	acatttcgt	catcgccac	ccagtccggc	6600
	ggcgagttcc	atagcgat	ggtttcattt	agcgcttca	atagatctt	ttcaggaacc	6660
	ggatcaaaga	gttcctccgc	cgctggaccc	accaaggcaa	cgctatgtc	tcttgcttt	6720
60	gtcagcaaga	tagccagatc	aatgtcgatc	gtggctggct	cgaagatacc	tgcaagaatg	6780
	tcattgcgt	gccatttcc	aaattgcagt	tcgcgtttag	tcggataac	ccacggaaatg	6840
	atgtcgctgt	gcacaacaat	ggtgacttct	acagcgcgg	gaatctcgct	ctctccaggg	6900
	gaagccgaag	tttccaaaag	gtcgttgc	aaagctcgcc	gcgttgttcc	atcaagcctt	6960
	acggtcaccg	taaccagcaa	atcaatatac	ctgtgtggct	tcaggccgccc	atccactgcg	7020
65	gagccgtaca	aatgtacggc	cagcaacgtc	ggttcgagat	ggcgcgtcgat	gacgccaact	7080
	acctctgata	gttgagtcga	tacttcggcg	atcaccgctt	cccccatgtat	gtttaacttt	7140

	gttttagggc	gactgccctg	ctgcgtaaca	tcgttgcgc	tccataacat	caaacatcga	7200
	cccacggcgt	aacgcgttg	ctgcttggat	gcccgaggca	tagactgtac	cccaaaaaaa	7260
	cagtcataac	aagccatgaa	aaccgcccact	gccccgggttc	catggacata	caaatggacg	7320
5	aacgataaa	cctttcacg	cccttttaaa	tatccgatta	ttctaataaa	cgctctttc	7380
	tcttaggtt	accgccaa	atatcctgtc	aaacactgt	agtttaaact	gaaggcggga	7440
	aacgacaatc	agatctagta	ggaaaacagct	atgaccatga	ttacgccaag	cttgcattgc	7500
	tgcaggtcg	ctctagagga	tcgatccccg	ggttaggtcg	tcccttatgt	tacgtccgt	7560
10	agaaacccca	acccgtgaaa	tcaaaaaact	cgacggcctg	tggcattca	gtctggatcg	7620
	cgaaaactgt	ggaattggtc	agcgttggtg	ggaaagcgcg	ttacaagaaa	gccgggcaat	7680
	tgctgtgcca	ggcagttta	acgatcagg	cgccgatgca	gatattcgta	attatgcggg	7740
	caacgtctgg	tatcagcgc	aagtctttat	accgaaagg	ttggcaggcc	agcgatcgt	7800
	gctgcgtttc	gatgcggtca	ctcattacgg	caaagtgtgg	gtcataatc	aggaagtgt	7860
15	ggagcatcg	ggcggctata	cgccatttga	agccgatgtc	acgcccgtatg	ttattgccc	7920
	gaaaagtgt	cgtaaagt	tgcttctacc	tttgatata	atataataat	tatcattaat	7980
	tagtagtaat	ataatatttc	aaatattttt	ttcaaaataa	aagaatgtag	tatatagca	8040
	ttgcctttct	gtagttata	agtgtgtata	tttaattta	taactttct	aatatatgac	8100
	caaattttgt	tgtatgtcg	gtatcaccgt	ttgtgtgaac	aacgaactga	actggcagac	8160
	tatcccgcgc	ggaatggta	ttaccgacga	aaacgcgaag	aaaaagca	cttacttcca	8220
20	tgatttttt	aactatggcg	gaatccatcg	cagcgtaatg	ctctacacca	cgccgaacac	8280
	ctgggtggac	gatataccg	tggtgcgc	tgtcgcga	gacttgcata	acgcgtctgt	8340
	tgactggcg	gtgggtggca	atggtgatgt	cagcggtgaa	ctgcgtgtat	cggatcaaca	8400
	ggtgtgtcg	actggacaag	gcactagcgg	gactttgca	gtgggtgaatc	cgcacctctg	8460
	gcaaccgggt	gaagggtatc	tctatgaact	gtgcgtcaca	gccaaaagcc	agacagagt	8520
25	tgatatactac	ccgcttcgcg	tccgcattccg	gtcagttggca	gtgaaggggcg	aacagtcc	8580
	gattaaccac	aaaccgttct	actttactgg	cttggcgtcg	catgaagatg	cggacttgc	8640
	tggcaaagga	ttcgataaacg	tgcgtatgg	gcacgaccac	gcattaatgg	actggattgg	8700
	ggcaactcc	taccgtac	cgcattacc	ttacgctgaa	gagatgctcg	actggcaga	8760
	tgaacatggc	atcggtgt	ttgtgaaatc	tgctgtgtc	gtcttaacc	tcttttagg	8820
	cattggttc	gaagcgggca	acaaggccga	agaactgtac	agcgaagagg	cagtcaacgg	8880
30	ggaaactcg	caagcgc	taacggcgat	taaagactgt	atagcgcgt	acaaaaacca	8940
	cccaagcgtg	tgatgtgg	gtattgcca	cgaaccggat	acccgtccgc	aagggtcacf	9000
	ggaatatttc	gcccactgg	cggaagcaac	cgtaaactc	gacccgacgc	gtccgatcac	9060
	ctgctcaat	gtaatgttct	gcgacgctca	caccgatacc	atcagcgatc	tcttgatgt	9120
	gctgtgcctg	aaccgttatt	acggatggta	tgtccaaagc	ggcgattttg	aaacggcaga	9180
35	gaaggtactg	aaaaagaac	ttctggctcg	gcaggagaaa	ctgcatacgc	cgattatcat	9240
	caccgaatac	ggcgtggata	cgttagccg	gctgcaactca	atgtacaccc	acatgtggag	9300
	tgaagagtat	cagtgtgc	gtctggatat	gtatcaccgc	gtctttgtat	gcgtcagcgc	9360
	cgtctcggt	gaacagggtat	ggaatttgc	cgattttgc	acctcgc	gcattattgc	9420
40	cgttggcggt	aacaagaaag	ggatcttcac	tgcgcaccgc	aaaccgaatg	cgccggctt	9480
	tctgtgc	aaacgcgtgg	ctggcatgaa	cttcggtgaa	aaaccgcacg	agggaggca	9540
	caaataatgg	ctcgaaattt	cccgcattcg	caaacatttgc	gcaataaaagn	ttcttaagat	9600
	tgaatcctgt	tgccggctt	gcatgtat	tcatataatt	tctgttgaat	tacgttaagc	9660
	atgtataat	taacatgtaa	tgcgtacgt	tatttatgag	atgggtttt	atgatttagag	9720
45	tcccgcatt	atacattaa	tacgcgatag	aaaacaaaat	atancgcgca	aactaggata	9780
	aattatcg	cgcgtgtca	tctatgttac	tagatcg	attcccatgc	ctcgagcaga	9840
	aagatataat	atgtaaaaaa	atgggtctat	atataatggaa	gttttcagg	agacaaagg	9900
	tctagaaaact	tccaaaaaaa	atccgataa	tatttggaa	gaaatacc	tttgggttgg	9960
50	ccccggcgc	gcccctatgt	ggccaaaaaa	ccacgatcta	atcccggtt	aattggtcta	10020
	atgttttaga	cttcttaat	gacgggctct	tatgcggc	taattggtct	aatttagata	10080
	aaatccta	taaataatgaa	cgcaacttag	cttccctct	ctctagttt	ctcgagctc	10140
	tttttcatgg	accttgaat	attgcggat	cactactcg	gaactcg	atacttcaga	10200
	gtgcacatct	actttgaatc	ttgatggta	gatcatctcg	gagaaatttct	cacagtgg	10260
	aggataacc	agttgcgaa	attgcattgc	ttcactcaca	gccaggatca	gccatgtcc	10320
55	caaggcaacc	cttgcgtact	catgcgcagg	cctgactact	tggggcctcg	cgccctgc	10380
	ttttgcgt	tcatgtgaca	cgtaaaatgt	tgagagaaat	agattactaa	atataccca	10440
	tttgcgtt	ctagatgt	atccataat	atgtatacc	aaaaatgtat	ttaaaactgt	10500
	ggttaggtcg	aaagatctat	taaaaagaaac	tctacgtata	ctcccccttc	ccaatcccc	10560
60	tccaggttt	taagacactt	tcgttcttt	ttgcccatt	ttaaccgtaa	atttgcgt	10620
	taaaaataag	ttataactgaa	tgtatataat	atgcgtacatt	cggtatgttgg	agacagggag	10680
	aggctggctg	gtgcgtgg	tgatcacgg	tcaaaaatgc	tgacttgc	cgccacaggc	10740
	ccgttggatt	ccactgaca	ccaattttc	ttgtttcg	ttgtgc	tttccgc	10800
	tcgaatattt	aaactgcg	gagaaaggca	agcaggcgc	catatcagca	cttgcact	10860
	cactgatcg	tcaatgt	ccaccttctc	tgccgcacg	ttttatata	tatggcaac	10920
65	aagtcatcg	ttgagaacag	aaacaaaaca	agaagagaac	tatttgagag	agagtagtta	10980
	cgccgcagcg	agtagctcc	catttctgac	gatcatgc	tacgataaaac	cggccggcgg	11040
	cgagaccgt	tagcaagg	gaaatgc	cacatgtcg	gctcatttct	cggcttttc	11100

	attttgcatt	tcgtcatgca	ggccctggac	actgacattt	ctctctttg	ctgttgaatg	11160
	aagaccctaa	ccttcacca	tcagcacccc	cctcaacttg	ataaggctag	acgaaaccga	11220
	tatgcattat	tgtatgat	ttgtgtcac	gaatattatg	aacccgttcc	caagagcaat	11280
5	actccattga	gatacaccc	ctcccttgc	ctgttcgttg	gtcccatatc	catagcagcc	11340
	ggcagtggcc	ttgactctga	ctgcccacgca	agtaataat	ctttaataaa	ctcgctgcct	11400
	tgcttcgtt	gtccatttg	aaatgcattgc	agtgacgaca	tgcacatgca	tagcttaatt	11460
	agctccatgc	atccactgt	tccattaatc	ccctatataa	aggactccat	atgcctcacc	11520
10	attcactcat	ccaccacagc	ttagcagcag	caacaaccag	tgccatagac	actctccatc	11580
	aacaaactct	agctgatcaa	tccttagctaa	gcttattaca	tagcaagccc	ggggatcctc	11640
	tagagtcgac	ctgcaggcgg	ccgcactagt	gatttaggat	ccaaacgcgag	ccaggacaag	11700
	cgaggaacct	tgcgtgcgag	gcgaggccgc	cccgctccga	ttcgattcga	cgcgcaggcg	11760
	caggcgcagg	gatggacgcc	ttctactcga	cctcgtcgcc	ggcggcgagc	ggctggggcc	11820
	acgactccct	caagaacttc	cgccagatct	ccccccgcgt	gcagtcccac	ctcaagctcg	11880
15	tttacactgac	tctatgctt	gcactggcct	catctgcgt	gggtgcttac	ctacacattg	11940
	ccctgaacat	cgccgggatg	ctgacaatgc	tcgcttgcgt	cggaactatc	gcctggatgt	12000
	tctcgggtgcc	agtctatgag	gagaggaaga	ggtttgggt	gctgatgggt	gcagccctcc	12060
	tggaaggggc	ttcgggttgg	cctctgattt	agcttgcct	agactttgac	ccaagcatcc	12120
	tcgtgacagg	gttgcgtgg	accgcacatc	cctttgggt	cttcctctggc	gccgcacatca	12180
20	tcgccaagcg	caggaggtac	ctgtacctcg	gtggcctgt	ctcgctcgcc	ctgtcgatcc	12240
	tgctctggct	gcagtttgc	acgtccatct	ttggccactc	ctctggcagc	ttcatgtttg	12300
	aggtttactt	tggcctgtt	atcttccctgg	gttacatgtt	gtacgacacg	caggagatca	12360
	tcgagagggc	gcacccatggc	gacatggact	acatcaagca	cgccctcacc	ctcttcaccg	12420
	actttgttgc	cgtccctgtc	cgactcctca	tcatcatgt	caagaacgc	ggcgacaagt	12480
25	cgaggagacaa	gaagaagagg	aagaggggt	cctgaacgtw	tctccgcac	atgtagatac	12540
	cgtcaccgcg	tcgacactca	ggcatgcccc	ctgaaatcac	cagtctctct	ctacaaatct	12600
	atctctctca	taataatgtt	tgtagtagttc	ccagataagg	gaatttaggt	tcttataagg	12660
	tttcgcctat	gtgttgagca	tataagaaac	ccttagtatg	tatttgatt	tgtaaaatac	12720
	ttctatcaat	aaaatttcta	attcctaaaa	ccaaaatcca	gtgggtaccg	agctcg	12776